

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: doktorský

Studijní obor: farmakologie a toxikologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Soňa Argalácsová

**Farmakogenomická predikce účinnosti a bezpečnosti tamoxifenu
při léčbě hormonálně dependentních žen s karcinomem prsu.**

**Pharmacogenetic prediction of tamoxifen efficacy and adverse effects
in hormonal dependent breast carcinoma patients.**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Prof. MUDr. Ondřej Slanař, PhD.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

.....

MUDr. Soňa Argalácsová

Identifikační záznam: ARGALÁCSOVÁ, Soňa. *Farmakogenomická predikce účinnosti a bezpečnosti tamoxifenu při léčbě hormonálně dependentních žen s karcinomem prsu.* [*Pharmacogenetic prediction of tamoxifen efficiency and adverse effects in hormonal dependent breast carcinoma patients.*]. Praha, 2017, 179 s., 2 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Slanař, Ondřej.

ABSTRAKT/SOUHRN

Úvod: Klinická účinnost tamoxifenu může být ovlivněna enzymy metabolizujícími toto léčivo a transportními molekulami, které se účastní systému využití tamoxifenu v organismu. Cílem mé práce bylo ověřit, zda u pacientek se sníženou aktivitou CYP2D6, danou variantním genotypem či výskytem inhibitorů v ko-medikaci, dochází ke snížení účinnosti terapie tamoxifenem. Dalším cílem bylo analyzovat vztah mezi účinností terapie tamoxifenem a polymorfismy ABCB1, u kterých se předpokládá změna transportní schopnosti P – glykoproteinu a také zjistit, zda zkoumané polymorfismy ovlivňují vznik a výskyt nežádoucích účinků, které se vyskytují při terapii tamoxifenem.

Metody: V retrospektivní studii jsme u 258 žen s hormonálně dependentním karcinomem prsu hodnotili účinnost a bezpečnost léčby tamoxifenem ve vztahu k polymorfizmům CYP2D6, ABCB1 a komedikaci.

Výsledky: CYP2D6 polymorfismy a ko-medikace ovlivňující aktivitu CYP2D6 neprokázala statistický významný vliv na účinnost terapie nebo vznik a projevy nežádoucích účinků spojených s terapií tamoxifenem. Byl zaznamenán pouze trend ke zkrácení TTE u pomalých metabolizérů CYP2D6. U ABCB1 polymorfismu rs2032582 rovněž nebyl zaznamenán významný vliv na účinnost terapie, ale byl pozorován trend k prodloužení TTE u nosiček variantních alel. V případě polymorfismu ABCB1 rs1045642 byl prokázán statisticky významný efekt prodloužení TTE u nosiček variantních alel v podskupině premenopauzálních pacientek ($p = 0.0012$, HR 0.69 (95% CI 0.21 to 2.31)). rs1045642 také významně ovlivňoval nástup gynekologických a vasomotorických nežádoucích účinků ($p = 0.0221$, HR = 1.0588), bez prokázaného vlivu na vznik žilních komplikací.

Závěry: Přestože tato práce neprokázala statistickou významnost sledovaných polymorfizmů pro variabilitu účinnosti léčby tamoxifenem, výsledky naznačují, že sledování komplexu více genetických biomarkerů může být vhodnou cestou pro predikci a zefektivnění hormonální terapie u karcinomu prsu.

Klíčová slova: CYP2D6; Farmakogenomika; Hormonální terapie; Karcinom prsu; Nežádoucí účinky; P-glykoprotein; Polymorfismy; Tamoxifen

ABSTRACT/SUMMARY

Background: The clinical efficacy of tamoxifen therapy may be modified by the drug-metabolizing enzymes and transporting molecules involved into the pharmacokinetics of tamoxifen. The aim of this study was to evaluate the association of CYP2D6, ABCB1 polymorphisms and comedication with efficacy and safety of tamoxifen treatment.

Methods: Totally 258 women with hormonal positive breast carcinoma were retrospectively evaluated in relation to CYP2D6, ABCB1 polymorphisms and comedication.

Results: CYP2D6 polymorphisms or co-medication affecting CYP2D6 activity demonstrated no statistically significant effect on the efficacy of tamoxifen therapy or adverse event incidence; there was only a trend towards shortening the time to event (TTE) in CYP2D6 poor metabolizers. ABCB1 polymorphism rs2032582 was not associated with clinical outcomes, while a trend towards an increase of TTE in variant allele carriers was noted. The ABCB1 polymorphism rs1045642 demonstrated statistical significance in premenopausal patients ($p = 0.0012$, HR 0.69 (95% CI 0.21 to 2.31), and its significant association was noted with gynaecological /vasomotor adverse events ($p = 0.0221$, HR = 1.0588), with no evidence of the influence on the incidence and onset of venous complications.

Conclusions: Although this work did not show clear significant impact of the studied polymorphisms on the variability of tamoxifen treatment response, the results suggest that testing of multiple genetic biomarkers in their complexity may be a suitable option towards prediction and individualization of hormonal therapy in breast cancer patients.

Key words: Adverse events; Breast cancer; CYP2D6; Hormonal therapy; P-glycoprotein; Pharmacogenomics; Polymorphism; Tamoxifen

Poděkování

V úvodu bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, Ph.D. za důsledné vedení mé práce, cenné rady a jistě za velkou trpělivost, kterou mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty University Karlovy v Praze a Farmakologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za pomoc při laboratorní části projektu.

Můj velký vděk za pomoc při získávání klinických údajů patří mým kolegyním a kolegům z Onkologické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze, jmenovitě MUDr. Olze Příbylové Ph.D. in memoriam, Doc. MUDr. Petře Tesařové Ph.D., prim. MUDr. Evě Sedláčkové MBA, Doc. MUDr. Bohuslavu Konopáskovi, CSc. a jistě i celému sesterskému kolektivu ambulance pod vedením staniční sestry Bc. Aleny Černé.

Za cenné rady, konzultace a pomoc při řízení klinické části výzkumu bych na tomto místě ráda poděkovala panu přednostovi Onkologické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze, prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc.

Za korekce, připomínky a konzultace, jako i za dlouholetou podporu, obětavost, velkou pracovitost a nesporné lidské a odborné kvality chci dále poděkovat PharmDr. Ireně Netíkové, Ph.D. a prim. MUDr. Pavlu Vítkovi Ph.D.

Děkuji celé Oborové radě Farmakologie a toxikologie za snahu o výchovu dalších generací k úctě k vědě a hodnotám, které vedou lékaře ke vzdělávání a odbornému růstu.

Nakonec, ale ne v poslední řadě, chci za celoživotní podporu, zázemí a nesmírnou lásku poděkovat svým drahým rodičům a blízkým.

Všem velice děkuji.

Finanční podpora: Projekt byl podpořen účelovou podporou MZ ČR: IGA 08/09, N 10563-3 a projektem Univerzity Karlovy „Progres Q25“.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	„Akceptor“: vzdálenost akceptoru a donoru“
ABCB1	ATP-binding cassette subfamily B member 1 /synonymum pro P-glykoprotein
ASCO	The Committee of the American Society of Clinical Oncology: odborná onkologická společnost v USA
ATAC	The Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination: studie, která srovnávala efekt tamoxifenu a IA v adjuvantní hormonální terapii postmenopauzálních pacientek
ATLAS	Adjuvant tamoxifen, longer against shorter: studie srovnávající rozdíl mezi 5-letou a 10-letou adjuvantní terapií tamoxifenem
ATP	adenosintrifosfát
BDM	Bone mineral density: kostní minerálová denzita
BIG-1-98	Interpreting Breast International Group: rovněž studie srovnávající efekt tamoxifenu a IA (letrozol) v adjuvantní hormonální terapii postmenopauzálních pacientek
BMI	Body mass index
bp	páry bazí: při stanovení délky restričních fragmentů DNA elektroforézou
BRCA	Breast Related Cancer: je to soubor genetických mutací s rodinným výskytem, a tedy predispozicí ke Ca prsu a dalším tumorům
Ca prsu	karcinom prsu
ChIP	Chromatinová immunoprecipitace
CYP450	Cytochrom P450
Da	Dalton: jednotka molekulové hmotnosti, která odpovídá jedné dvanáctině hmotnosti volného izotopu uhlíku
DCIS	duktální karcinom in situ: histologický typ karcinomu prsu
DFS	Disease Free Survival: doba bez známek nemoci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group – odborná skupina v USA
EFS	Event Free Survival: doba do objevení známek nemoci
EM	extensive metabolizer: rychlý metabolizátor, nosič dvou plně funkčních alel
ER	estrogenový receptor

FAD	Flavin adenin dinucleotid
FDA	Food and Drug Administration: léková agentura v USA
FMN	Flavin mononucleotide
G	Grade nádoru: stupeň diferenciacie nádoru
IA	inhibitory aromatáz
IDFS	Invasive Disease Free survival: doba bez známek invazivního onemocnění
IM/hetEM	intermediate metabolizer / heterozygous Extensive metabolizer
ITPC	The International Tamoixifen Pharmacogenetics Consortium
Ki-67	protein asociován s buněčnou proliferací / proliferační index
LCIS	lobulární karcinom in situ: histologický typ karcinomu prsu
MDR-1	Multidrug Resistance Protein 1, gen pro P-glykoprotein (P-gp), rovněž ABCB1 gen
MFO	Mixed function oxidases
mRNA	mikroribonukleová kyselina
NCoR	Nuclear receptor corepressor
NDMT	N-desmetyltamoxifen
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NÚ	nežádoucí účinky
4-OH-TAM	4-hydroxytamoxifen
OATP1B1	organický anionový transpotní polypeptid B1
OS / mOS	Overall survival /median Overall survival: doba přežití
P-gp	P-glykoprotein
p160	protein 160
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism
PFS	Progression Free Survival: doba bez progresu
PM	poor metabolizer: pomalý metabolizátor
RFS	Reccurence Free Survival: nterval do prokázání rekurence nemoci
RNA	ribonukleová kyselina
RR	Recurrence Rate: pravděpodobnost návratu onemocnění
SERM	Selective Estrogen-Receptor Modulators: selektivní modulátory zpětného vychytávání estrogenů
SMRT	Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
SNP	single nucleotide polymorphisms

SSRI	Selective Serotonine Reuptake Inhibitors: léky ze skupiny antidepresiv, působící jako inhibitory selektivního zpětného vychytávání serotoninu
SULT	sulfotransferáza
T	stadium nemoci
TMX	Tamoxifen / tamoxifen
TTP	Time to Progression: doba do progresu
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferaza
UrM	ultrarapid metabolizer: ultrarychlý metabolizátor, nosič více než dvou funkčních alel
ÚKBLD VFN a 1.LF UK v Praze	Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1.lékařské fakulty University Karlovy v Praze
vt / mt	variantní alela/ mutovaná alela
wt	wild type alela
5y DFS	pětileté hodnocení doby do návratu onemocnění

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Sumární IF: 5,634

1. Publikace, které jsou podkladem disertační práce

a) s impact factorem (uvést hodnotu IF)

- 1.) **Argalácsová S**, Slanař O, Vitek P, Tesařová P, Bakhouché H, Draždáková M, Bartošová O, Zima T, Pertuželka L. Contribution of ABCB1 and CYP2D6 genotypes to the outcome of tamoxifen adjuvant treatment in premenopausal women with breast cancer. *Physiol Res.* **2015**;64 Suppl 4:S539-47.PMID:26681084, **IF: 1,618**
- 2.) **Argalácsová S**, Slanař O, Bakhouché H, Pertuželka L. Impact of ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen treatment outcomes and adverse events in breast cancer patients. *JBUON.* **2017** – doloženo potvrzením o přijetí, **IF: 0,88**

b) bez IF

- 1.) **Argalácsová S.**, Slanař O., Petruželka L. Farmakogenomická predikce účinnosti tamoxifenu v léčbě hormonálně dependentních postmenopauzálních žen s karcinomem prsu na základě korelace aktivity CYP2D6 a rozboru genotypu MDR-1 genu pro P-glykoprotein. *Onkologie.* **2010**;4(5):326-331.

2. Publikace, které jsou bez vztahu k tématu disertační práce

a) s IF (uvést hodnotu IF)

- 1.) Hartinger J, Veselý P, Matoušková E, **Argalacsová S**, Petruželka L, Netíková I. Local treatment of hand-foot syndrome with uridine/thymidine: in vitro appraisal on a human keratinocyte cell line HaCaT. *Scientific World Journal.* **2012**;2012:421325. doi: 10.1100/2012/421325. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22919318, **IF: 2,43**
- 2.) Kubes J, Dedeckova K, Cvek J, Vondráček V, Dvorak J, **Argalacsová S**, Navrátil M, Buriš J. Treatment of high risk prostate cancer with combined radiotherapy and hormonal treatment- results and identification of factors influencing outcome. *J BUON.* **2013** Jul-Sep;18(3):669-74.PMID:24065481, **IF: 0,706**

b) bez IF

- 1.) Petruželka L, **Argalácsová S.**, Petrtyl J. Hepatocelulární karcinom-nové možnosti léčby. *Farmakoterapie.* 2/2008.
- 2.) Adamicová K, Fetisová Ž, Mellová Y, Meluš V., Maarouf Z, **Argalácsová S.** Hodnotení bazální membrány u morfeaformního (invazivního) bazaliómu. *Čes-slov. Derm.* **2005.** 2:76-81.

3. Kapitoly v knihách:

- 1.) Soňa Argalácsová. 2. Adynamie. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014
- 2.) Soňa Argalácsová. 57. Hematurie. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014
- 3.) Soňa Argalácsová. 97. Obrny. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014, p. 448-65
- 4.) Soňa Argalácsová. 98. Oligurie a anurie. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014, p. 468-72
- 5.) Soňa Argalácsová. 116. Poruchy reči. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014, p. 543-48
- 6.) Soňa Argalácsová. 127. Proteinurie. In book: Lukáš K., Žák A. et al. Chorobné znaky a príznaky: diferenciálna diagnostika. Grada Publishing 2014, p. 602-8

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1	Úvod.....	14
1.2	Literární přehled problematiky	20
1.2.1	Tamoxifen, jeho metabolismus a účinek	20
1.2.2	Cytochrom P450 a jeho role v biotransformaci a efektivitě terapie tamoxifenem	25
1.2.2.1	CYP2D6	27
1.2.2.2	CYP1B1	38
1.2.2.3	CYP2B6	39
1.2.2.4	CYP2C9	40
1.2.2.5	CYP2C19	41
1.2.2.6	CYP3A4 a 3A5	41
1.2.2.7	CYP19A	43
1.2.3	P – glykoprotein.....	44
1.2.4	Enzymy konjugace.....	47
1.2.4.1	Sulfotransferázy (SULT).....	47
1.2.4.2	UDP- glukuronyltransferázy (UGT)	47
1.2.5	Vliv OATP1B1	48
1.2.6	Vliv polymorfismů estrogenového receptoru (ER).....	48
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	51
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	52
3.1	Metody klinické části experimentu	52
3.2	Metody laboratorní části experimentu	53
3.2.1	Izolace DNA z periferní krve.....	53
3.2.2	Metodika stanovení genotypu CYP2D6	53
3.2.3	Metodika stanovení genotypu ABCB1 genu pro P-gp	56
3.2.3.1	Genotypizace <i>rs1045642</i>	56
3.2.3.2	Genotypizace <i>rs2032582</i>	57
3.3	Statistické metody	57
4	VÝSLEDKY	59
4.1	Demografie a základní popisná statistika souboru.....	59
4.1.1	Demografie celého souboru	59

4.1.2.	Základní popisná statistika demografických a klinických parametrů.....	66
4.1.1.1	Věk v době diagnózy, délka užívání tamoxifenu, délka sledování	66
4.1.1.2	Hormonální receptory	67
4.1.1.3	Stadium nemoci.....	70
4.2	Analýzy sledovaných polymorfismů <i>CYP2D6</i> , <i>ABCB1</i> a ko-medikace	71
4.2.1	Ko-medikace induktory a inhibitory <i>CYP2D6</i>	71
4.2.2	Primární analýza polymorfismů <i>CYP2D6</i>	73
4.2.3	Primární analýzy polymorfismů <i>ABCB1</i>	76
4.2.3.1	Polymorfismus <i>rs2032582 ABCB1</i> genu pro P-glykoprotein (<i>exon21</i>).....	76
4.2.3.2	Polymorfismus <i>rs1045624 ABCB1</i> genu pro P-glykoprotein (<i>exon 26</i>)....	79
4.2.4	Multifaktoriální analýza vztahů zkoumaných znaků a polymorfismů.....	84
4.3	Analýza výskytu nežádoucích účinků při terapii tamoxifenem	92
4.3.1	Demografie a popis pacientek s nežádoucími účinky	92
4.3.2	Vliv ko-medikace na výskyt nežádoucích účinků	95
4.3.3	Vliv polymorfismů <i>CYP2D6</i> na výskyt nežádoucích účinků	98
4.3.4	Vliv polymorfismů <i>ABCB1</i> genu na výskyt nežádoucích účinků.....	100
4.3.4.1	Analýza polymorfismu <i>rs2032582</i> (v <i>exonu 21</i>).....	100
4.3.4.2	Analýza polymorfismu <i>rs1045624</i> (v <i>exonu 26</i>).....	104
5	SOUHRN VÝSLEDKŮ A DISKUZE	110
6	ZÁVĚR.....	117
7	REFERENCE	119
8	PŘÍLOHY	143

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním ženské části populace. Jeho incidence a prevalence celosvětově pozvolna narůstá a hledání vhodných prediktorů je v době individualizace terapie velkou výzvou směřující k zefektivnění terapie. S ohledem na velkou inter- a intra-individuální genetickou rozdílnost pacientek, je nutné zohlednit nejenom faktory asociované s nádorem, ale rovněž i „genetickou výbavu“ jednotlivých pacientek, a tím schopnost pacientky léčivo metabolizovat a „zůžtkovat“ (Higgins MJ. et al., 2009).

Jednou ze základních léčebných modalit a jednou z prvních cílených terapií vůbec je pro pacientky s hormonálně pozitivním karcinomem prsu hormonální terapie. Zlatým standardem hormonální terapie je od roku 1977 selektivní modulátor estrogenních receptorů (SERM) – tamoxifen (Del Re M. et al., 2012). Early Breast cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG), která v roce 2005 zkoumala přínos adjuvantní terapie tamoxifenem u hormonálně pozitivních pacientek v průběhu patnáctiletého sledování prokázala, že pětiletá adjuvantní hormonální terapie tamoxifenem redukuje roční riziko návratu karcinomu prsu o 39 % (EBCTCG, 2005). V dalších letech přinesly meta-analýzy studií zkoumajících adjuvantní hormonální terapii postmenopauzálních pacientek s hormonálně dependentním nádorem prsu průkazy vyšší účinnosti inhibitorů aromatáz (dále IA). (Howell A. et al., 2005, Forbes JF. et al., 2008). I přes tyto výsledky zůstává tamoxifen důležitým lékem v terapii hormonálně dependentního karcinomu prsu. Je lékem volby v terapii premenopauzálních žen a v profylaxi karcinomů *in situ* a jeho role v adjuvantní a paliativní terapii postmenopauzálních žen rovněž neskončila. Léky ze skupiny IA nejsou vhodné pro všechny pacientky (např. pacientky s primárně diagnostikovanou osteoporózou a osteopenií), a dále je tamoxifenem léčená část postmenopauzálních pacientek, jejichž terapie byla zahájena před uvedením této změny do klinické praxe nebo mají onemocnění s nízkým rizikem. Navíc, při racionálním pohledu na studie, které upřednostnili IA před tamoxifenem u postmenopauzálních pacientek, např. studie ATAC, je zřejmé, že rozdíl v počtu recidív onemocnění (recurrence rate – RR) mezi tamoxifenem a IA je méně než 5% (Thürlimann B. et al., 2005, Forbes JF. et al., 2008, Schroth W. et al., 2009). Podle publikovaných studií se ukazuje,

že postmenopauzální pacientky s plně funkčním CYP2D6 (homozygoti pro wild-type alely) mají pětileté přežití bez známek nemoci (5y DFS) stejné ev. lepší při adjuvantní terapii tamoxifenem, než při adjuvanci IA (*Teh LK. et al., 2012*). Ve světle těchto faktů vyvstává otázka, zda lze primárně vytypovat skupinu postmenopauzálních pacientek, pro které by byla primární terapie tamoxifenem minimálně stejně účinná jako terapie IA a ponechat tak IA pro další případnou hormonální terapii. Nezanedbatelnou výhodou této individualizace terapie by bylo i snížení nákladů na terapii, tedy hledisko farmakoekonomické. V neposlední řadě by racionální způsob predikce efektivity tamoxifenu pomohl oddiferencovat pacientky, pro které je terapie tamoxifenem naopak nevhodná, což by mohlo předejít možným nežádoucím účinkům eventuálně relapsu onemocnění, a v neposlední řadě i k farmakoekonomickému přínosu.

Obdobně jak mnozí jiní autoři se domníváme, že odpověď na tuto otázku “individuální terapie šité na míru“ lze hledat ve farmakogenomice. Proto se v posledních několika letech intenzivně zkoumá efektivita terapie tamoxifenem z pohledu funkčnosti enzymů, které se účastní na metabolismu tamoxifenu. Antiestrogenní efekt tamoxifenu je v organismu zprostředkován jeho aktivními metabolity: 4-hydroxytamoxifenem (4-OH-TAM) a zejména 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifenem (endoxifenem), které vznikají v organismu enzymatickou přeměnou katalyzovanou enzymy z rodiny cytochromu P450. Afinity aktivních metabolitů tamoxifenu k estrogenovým receptorům je, ve srovnání s tamoxifenem, až 100x vyšší a jejich schopnost pozastavovat proliferaci tkáně závislou na estrogenu je 30 – 100x vyšší (*Brauch H. et al, 2008, Kiyotani K. et al, 2010, Reyes León-Cachón RB. et al, 2012*). Míra přeměny tamoxifenu na jeho aktivní metabolity (endoxifen a 4-hydroxytamoxifen) je značně závislá na aktivitě CYP2D6, která může být ovlivněna jak geneticky, tak iatrogeně – ko-medikací (inhibitory / induktory) např. některými antidepresivy, antiarytmiky a antihypertenzivy (*Borges S. et al., 2006, Lim YC. et al., 2007, Kiyotani K. et al., 2008, Goetz MP. et al., 2007, Zanger UM. et al., 2008, MacLeod AK et al., 2016*).

CYP2D6 je vysoce polymorfní enzym s velkou interetnickou i interindividuální variabilitou. Farmakogenetickými studiemi bylo identifikováno více než 100 alelických variant CYP2D6 (*Ferraldeschi R., Newman WG., 2010*). V evropské populaci je nejfrekventovanější variantní alelou CYP2D6*4 (12 – 21 %), dále CYP2D6*5 (2 – 7 % v různých populacích), v asijské populaci CYP2D6*10 (>50 %) a v africké a afroamerické populaci CYP2D6*17 (20 – 35%) (*Gaedikg A. et al., 1999, Ingelman-Sundberg M., 2001,*

Bradford LD., 2002, Rodriguez-Antona C., Ingelman-Sundberg M., 2005, Brauch H. et al., 2009). Dle genotypu lze predikovat fenotyp. Rychlé metabolizérky (Extensive metabolisers, EM) mají 2 plně funkční alely, ultrarychlé metabolizérky (UrM) jsou pacientky s více než 2 funkčními alelami *CYP2D6*. Pomalé metabolizérky (PM) mají ve svém genomu 2 funkčně deficitní alely a pacientky s heterozygotním uspořádáním alel – tj. s jednou deficitní a jednou funkční (divokou, wild type) alelou jsou intermediární metabolizérky (IM neboli hetEM), stejně jako pacientky, jež mají ve svém genomu alely vedoucí k jen parciálnímu deficitu aktivity (Sachse C. et al., 1997, Kirchheiner J., 2008, Bijl MJ. et al., 2009). V evropské populaci je frekvence lidí s kompletně deficitními alelami *CYP2D6*, klasifikovaných jako PM 5 – 10 %, a přibližně 40 % populace reprezentují jedinci s parciálním funkčním deficitem, klasifikovaní jako heterozygoté (IM, hetEM) (Zanger UM. et al., 2004, Buzkova H. et al., 2008, Kirchheiner J. et al., 2008).

V průběhu let bylo publikováno mnoho tzv. „pozitivních studií“, převážně retrospektivních studií, které naznačují, že u pacientek s variantními alelami *CYP2D6* (fenotypem IM a PM) dochází k vyššímu riziku návratu onemocnění (RR), zkrácení času bez nemoci (DFS) respektive času do návratu nemoci (RFS), a některé rovněž prokazují horší medián přežití (mOS) (Schroth W. et al., 2007, Schroth W. et al., 2009, Bonani B. et al., 2006, Goetz MP. et al., 2005, Goetz MP. et al., 2007, Newman WG. et al., 2008, Province MA et al., 2013). Část těchto studií probíhala v Asii a tyto studie jsou proto ohledně zkoumaných variantních alel značně nesourodé (Jin Y. et al., 2005, Lim YC. et al., 2005, Kiyotani K. et al., 2010). Naproti tomu existuje zhruba srovnatelné množství tzv. „negativních studií“, které neprokazují přínos testování polymorfismu *CYP2D6* na účinnost terapie tamoxifenem (Nowell SA. et al., 2005, Wegman P. et al., 2007, Abraham JF. et al., 2010, Thompson AM. et al., 2011). Kontroverzní výsledky studií, které zkoumaly vliv polymorfismů *CYP2D6* na účinnost terapie tamoxifenem vedly k tomu, že rutinní stanovování polymorfismů *CYP2D6* dosud nenašlo v klinické praxi své místo (Burstein HJ. et al., 2014). Jasný konsenzus prediktivní hodnoty testování aktivity *CYP2D6* nebyl dosažen a aktivně se o této problematice a implementaci genetického testování *CYP2D6* před zahájením adjuvantní hormonální terapie již několik let diskutuje (Dezentje VO. et al., 2009, Higgins MJ. et al., 2009). Jedním z návrhů uplatnění prediktivního testování *CYP2D6* v klinické praxi je doporučení genetického testování *CYP2D6* u nově diagnostikovaných postmenopauzálních pacientek indikovaných k adjuvantní hormonální terapii s předpokládaným vysokým rizikem terapie inhibitory

aromatáz (např. u pacientek s osteopenií nebo vyjádřenou osteoporózou) (Punglia RS. *et al.*, 2008). Navíc některé publikované práce v posledních letech prokazují, že navýšením denní dávky tamoxifenu lze i u pacientek s variantními polymorfismy *CYP2D6* dosáhnout efektu, který je srovnatelný s efektem u plně funkčního fenotypu *CYP2D6* nebo s efektem IA u postmenopausálních pacientek (Irvin WJ. *et al.*, 2011, Kiyotani K. *et al.*, 2012, Dezentjé VO *et al.*, 2015).

Divergence výsledků vlivu *CYP2D6* na účinnost terapie tamoxifenem vedla k dalšímu logickému předpokladu, že efekt terapie tamoxifenem je spíše kombinací několika zásahů do jeho metabolismu a distribuce v organismu, než pouze vlivem jediného konkrétního polymorfismu. Průlomovou prací, ve které se prokazuje, že i při nevýznamném statistickém vlivu jednotlivých polymorfismů na efekt terapie, může být vzájemná kombinace několika polymorfismů již statisticky významná, publikoval v roce 2012 Teh a kolektiv. Tato práce prokazuje, že kombinace IM heterozygotů pro *CYP2D6* a wild – type homozygotů polymorfismu *ABCB1* genu v exonu 26 C3435T (*rs1045624*) vede ke zkrácení RFS (času do návratu onemocnění) ze 48 měsíců na 12 měsíců (Teh LK. *et al.*, 2012). V posledních letech byly publikovány další práce poukazující na možnost vlivu polymorfismů genu pro P -glykoprotein na účinnost farmakoterapie tamoxifenu (Iusuf D. *et al.*, 2011, Teft WA. *et al.*, 2011). P – glykoprotein (P -gp, ABCB1) je lidský efluxní membránový transportér závislý na ATP. Patří do rodiny ABCs (ATP – binding cassett's) a zodpovídá za aktivní transport léků a xenobiotik v organismu. Je nesporné, že jeho poruchy jsou jednou z příčin mnohočetné lékové rezistence, včetně rezistence na cytostatika (Gottesman MM. *et al.*, 1996, Vlček J. *et al.*, 2002, Ambudkar SV. *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že zvýšená exprese P-gp, která může vznikat například v souvislosti s indukci navozenou chemoterapií, byla u karcinomu prsu významně asociována s rychlejším návratem nemoci (Tsukamoto F. *et al.*, 1997, Vargas-Roig LM. *et al.*, 1999, Teh LK. *et al.*, 2012). Dnes je známo, že některé z objevených polymorfismů *ABCB1* mají funkční dopad na expresi P-gp v cílové tkáni a/nebo na transportní kapacitu substrátů přenášených P -gp (Hoffmeyer S. *et al.*, 2000; Sakaeda T. *et al.*, 2003). Polymorfismus *rs1045642* (C3435T) byl v četných studiích asociován s výsledkem terapie u karcinomu prsu i dalších onemocnění (Kafka A. *et al.*, 2003, Kelleher D. *et al.*, 2004, Cizmarikova M *et al.*, 2010). Polymorfismus *ABCB1 rs2032582* (G2677A/T, exon 21) vede po záměně jedné aminokyseliny (alanin a serin) ke změně hydrofilního na lipofilní residuum a následnou změnu afinity vazebního

místa, která může ovlivňovat funkci P-gp nebo jeho expresi (*Hoffmeyer S. et al., 2000, Taheri M. et al., 2010*). Dosavadní výsledky studií, které zkoumaly významnost polymorfismů P-gp, potažmo kombinace sledovaných polymorfismů, zatím neodhalily jejich přesný význam a eventuální prediktivní hodnotu. Tato problematika se ale intenzivně zkoumá a v posledních letech dochází doslova k renesanci zájmu o tuto problematiku.

Navíc se v poslední době často diskutuje otázka vlivu polymorfismů dalších enzymů a transportérů, které se aktivně podílejí na přeměně, transportu a eliminaci tamoxifenu v organismu na efekt hormonální terapie tamoxifenem – například organického anionového transportního polypeptidu 1B1 (OATP1B1) nebo sulfonyltransferáz (SULT1A1, SULT1A2, SULT1A4) a UDP-glukuronyltransferáz (UGT) (hlavně UGT2B15) (*Nowell S. et al, 2002, Jin Y. et al., 2005, Sun D. et al., 2006, Romero-Lorca et al., 2015, Zhang X. et al., 2015*).

Role jednotlivých polymorfismů a jejich vliv na vznik nežádoucích účinků (NÚ) spojených s terapií tamoxifenem (převážně gynekologické nežádoucí účinky – hyperplasie endometria a karcinom endometria, jako i vasomotorické NÚ (návaly) a žilní komplikace charakteru trombembolických příhod) jsou v literatuře zmiňovány velmi útržkovitě a jejich vzájemný vztah, pokud víme, nebyl dosud systematicky zkoumán. Z řady publikovaných prací vyplývá, že některé polymorfismy, které vedou ke snížení účinnosti terapie tamoxifenem, vedou i ke zvýšenému výskytu nežádoucích účinků spojených s terapií tamoxifenem (*Goetz MP. et al., 2005, Teh LK. et al., 2012, Pinho JRR. et al., 2014*). Tato problematika si rovněž zaslouží další výzkum, protože případná možnost predikce nežádoucích účinků je opět další možností individualizace, zefektivnění a zkvalitnění terapie a jejich výsledků.

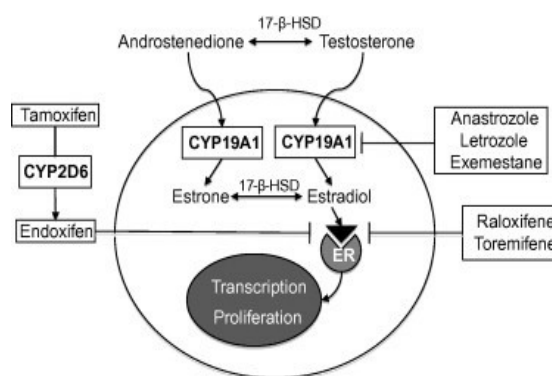
Velká spleť různě metodologicky vedených studií s různými výstupy spíše vede k nepřehlednosti a určité pochybnosti o správném směru výzkumu vlivu farmakogenetiky na efekt terapie tamoxifenem. Několik autorských týmů proto učinilo pokus o systematizaci a zpřehlednění dosavadních dat pomocí metaanalýz dostupných studií. Velice zajímavou byla metaanalýza 12 studií ($n = 4\,973$ pacientek), ve které autoři potvrzují statisticky významné zkrácení doby bez invazivního onemocnění (IDFS, HR 1.25, $p = 0.009$), ale pouze v případě, že jsou při výběru pacientek dodržena pevná vstupní kritéria (hormonálně dependentní postmenopauzální pacientky, tj. ER minimálně 10%), odléčené pětiletou adjuvantní hormonální terapií tamoxifenem). U studií, které neměly pevně stanovená vstupní kritéria nebyl vliv variant *CYP2D6* zřejmý (*Province MA. et al.,*

2013). Další metaanalýza studií vedená Mezinárodním konzorciem pro farmakogenetiku tamoxifenu (The International Tamoxifen Pharmacogenetics Consortium – ITPC) zkoumající vliv polymorfismů *CYP2D6* a *ABCB1* a iatrogenního ovlivnění induktory *CYP2D6* (antidepresiva ze skupiny SSRI (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu), např. potentní inhibitory (paroxetin, fluoxetin), nebo méně potentní inhibitory (citalopram, escitalopram, setralin, fluvoxamin) byla publikována v roce 2014 Croinem-Fentonem a spol.. Využitím náhodného efektu metaanalytického modelu dokázali rozeznat heterogenitu napříč studiemi, které se často odchylovaly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Metaanalýza prokázala nenulový, ale malý vliv PM fenotypu *CYP2D6* na efekt terapie tamoxifenem se silnější asociací *CYP2D6*10* alel než *CYP2D6*4* a rovněž velmi malý vliv ko-medikace SSRI užívaných konkomitantně s tamoxifenem. Další budoucnost vidí autoři v prozkoumání vlivu polymorfismů odděleně pro premenopauzální a postmenopauzální pacientky a hledání vzájemných vazeb více polymorfismů, které se uplatňují na využití tamoxifenu v organismu (Cronin-Fenton DP *et al.*, 2014). Pokus o tzv. „genotypem – řízenou hormonální terapii“ zatím nevedl k uplatnění testování polymorfismů v praxi. The Committee of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) doporučuje opatrnost při konkomitantním podávání tamoxifenu a léků, které ovlivňují funkci *CYP2D6*, ale s poznámkou, že chybí dostatečná data k rutinnímu testování *CYP2D6* (Burstein HJ *et al.*, 2014). V roce 2015 se ukázalo, že výsledky studií BIG-98 a ATAC byly zatíženy velkým odklonem od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, zřejmě z důvodů nesprávné metodiky stanovení genotypu *CYP2D6* z parafinových vzorků tumoru, která vede k ztrátě heterozygosity a falešnému zvýšení homozygotů (Goetz MP. *et al.*, 2015, Johnson JA., Hamadeh IS. a Langae TY., 2015). Tento fakt začínají zohledňovat poslední doporučení odborných společností (ITCP a ASCO), které na rozdíl od předešlého jasně negativního postoje k přínosu genotypizace *CYP2D6* nyní opatrně připouštějí jeho možný benefit pro praxi a volají po vývoji přesného algoritmu (Del Re M *et al.*, 2016, Herz DL. a Rae J., 2016, Goetz MP, Ratain M a Ingle JN, 2016). Pevně doufáme, že očekávané rozluštění přinesou velké randomizované prospektivní studie očekávané v nejbližších letech.

1.2 Literární přehled problematiky

1.2.1 Tamoxifen, jeho metabolismus a účinek

Velká část pacientek s karcinomem prsu je tzv. hormonálně dependetních (tj. exprese estrogenních receptorů (ER) v tumoru je $\geq 10\%$). Běžně se udává, že více než polovina (60 %) premenopauzálních pacientek a tři čtvrtiny (75 %) postmenopauzálních pacientek vykazuje hormonální dependenci (*Del Re M. et al., 2012*). Hormonální terapie je u těchto pacientek významnou cílenou léčebnou modalitou jak v preventivním tak v léčebném smyslu. Estrogen, vylučován v premenopauzálním období zejména v ovariích a v postmenopauzálním období především z nadledvin, působí na intracelulární estrogenové receptory (ER) různých tkání jako faktor proliferace. Schematické znázornění aktivity pohlavních steroidních hormonů na buňky karcinomu prsu je na obrázku 1 (**Obr. 1**). Testosteron a androstendion, produkované v postmenopausálních nadledvinách, jsou v různých tkáních stejně jako v tkáních nádoru prsu, opět pomocí enzymu z rodiny cytochromů – aromatázy (CYP19A1), hydroxylovány na estradiol a estron. Estradiol (E2) se následně váže na jednu z podjednotek estrogenového receptoru (ER α) a následná změna konformace umožňuje navázání koaktivátorů (např. p160), které urychlují spojení komplexu ER – estrogen s promotory DNA. Výsledná transkripce vede k iniciaci a potenciaci buněčné proliferace, růstu a přežití (*Del Re M. et al., 2011*).



Obr. 1: Schéma účinku steroidních hormonů a jejich inhibitorů u karcinomu prsu

Zdroj: (převzato z *DeL Re M. et al., 2012*)

POZN: ER – estrogenový receptor, 17βHSD – 17β-hydroxysteroiddehydrogenáza.

V hormonální terapii karcinomu prsu se v současnosti využívají tři skupiny léků, které blokují pronádorový účinek ženských pohlavních hormonů na nádorové buňky. První skupinou jsou **selektivní modulátory zpětného vychytávání estrogenů (SERM)** – tamoxifen, raloxifen a toremifen. Druhou skupinou léků jsou **inhibitory aromatáz (IA)** – na nesteroidní bázi letrozol, anastrozol a na steroidní bázi exemestan. IA účinkují pomocí blokády aromatázy (CYP19A1) a brání tvorbě estrogenu a estradiolu z androstendionu a testosteronu, které jsou dominantním zdrojem ženských pohlavních hormonů po menopauze. Do třetí skupiny léků patří **fluvestrant**, který působí podobně jako tamoxifen bez antagonistických účinků a svojí vazbou na ER způsobuje degradaci ER, čili jeho účinek lze vyjádřit jako selektivní downregulaci ER (*Robertson LF., Nicholson R. Bundred NJ., 2001*).

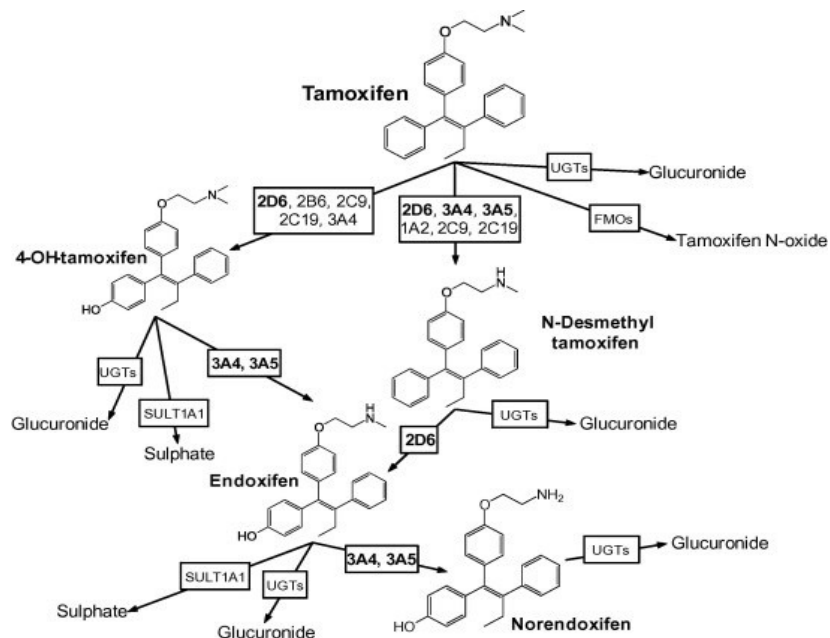
Tamoxifen patří mezi selektivní modulátory zpětného vychytávání estrogenů (SERM). Charakter jeho účinku na estrogenových receptorech je smíšený – působí tedy jako antagonistista i agonista. Tamoxifen a jeho aktivní metabolity vystupují jako antagonisté přirozeného cirkulujícího estrogenu na ER např. ve tkáni estrogen pozitivního Ca prsu a jako agonisté ER např. ve tkáni endometria (jedním z nežádoucích účinků tamoxifenu je hyperplasie endometria až vznik endometriálního karcinomu). Pomocí imunoprecipitace (ChIP) byla Shangem a spol. ozřejmena podstata smíšeného antagonisticko – agonistického efektu tamoxifenu, kde v některých tkáních vede aktivace ER k nahromadění korepresorů (např. NCoR, SMRT), čímž je přerušena estrogenem zprostředkovaná signální dráha, a v jiných tkáních působí tamoxifen a jeho metabolity na aktivaci koaktivátorů a dráha je naopak neustále aktivována (*Shang Y. et al., 2000*).

V terapii a prevenci karcinomu prsu zůstává tamoxifen nadále významným lékem s relativně širokým portfoliem indikací. Je používán v hormonální profylaxi hormonálně dependentních, neinvazivních karcinomů (DCIS a LCIS). Dále je výhradním lékem s prokázaným účinkem v adjuvantní terapii hormonálně dependentních karcinomů prsu u premenopauzálních pacientek. Výsledky studií ATAC a BIG 1-98 vedly ke změně standardní adjuvantní hormonální terapie postmenopauzálních pacientek ve prospěch IA (*Thürlimann B. et al., 2005, Howell A. et al., 2005, Forbes JF. et al., 2008*). Tímto ale uplatnění tamoxifenu v adjuvantní terapii postmenopauzálních pacientek neskončilo. Na základě konsenzu St. Gallen 2009 je nadále možné zahájit adjuvantní hormonální léčbu tamoxifenem ve skupině nízké rizikových postmenopauzálních pacientek (tj. vyšší věk, nízký index proliferace- Ki67, vysoký stupeň exprese hormonálních receptorů, nízký

stupeň diferenciace G, nízké stádium nemoci, nepřítomnost nádorové angio- a lymfangio- invaze) (Aebi S. et al., 2011). Tamoxifen je také indikován v paliativní hormonální terapii u pacientek s metastatickým karcinomem prsu.

Obvyklá denní dávka tamoxifenu je 20 mg perorálně. V případě nežádoucích účinků lze dávku redukovat na 10 mg/ den. Existuje několik přístupů k délce hormonální adjuvantní terapie a postupem času je zjevná tendence hormonální terapii spíše prodlužovat nad dobu dnes minimálně doporučovaných 5 let. V prevenci vzniku druhostranného nádoru prsu u neinvazivních nádorů *in situ* a u premenopauzálních pacientek zůstává nadále minimální doporučená délka užívání 5 let, s případným prodloužením pomocí IA po překonání menopauzy na celkovou délku 10 let. U postmenopauzálních pacientek lze zahájit terapii tamoxifenem 2 – 3 roky s následnou hormonální terapií IA do 5 až 10 let (tvz. prodloužená hormonální terapie). U pacientek s generalizací nemoci se v případě indikace paliativní hormonální terapie zahajuje léčba tamoxifenem, a tato trvá do progresu onemocnění, nebo do objevení nežádoucích účinků.

Tamoxifen je proléčivo a maximum jeho účinku je zprostředkováno jeho výše uvedenými účinnějšími aktivními metabolity. Schématické znázornění cest biotransformace tamoxifenu je na obrázku číslo 2 (**Obr. 2**).



Obr. 2: Schématické znázornění biotransformace Tamoxifenu

Zdroj: (převzato z DeL Re M. et al., 2012)

POZN: UGTs – uridin 5'-difosfo-glukuronosyltransferáza, SULT1A1 – sulfotransferáza 1A1, FMOs – flavin-obsahující monoxydáza, CYP- členové rodiny cytochromu P450, kteří se účastní biotransformace tamoxifenu.

Biotransformací tamoxifenu vznikají metabolity s 30 – 100krát vyšší antiestrogenní aktivitou (*Brauch H. et al., 2008, Kiyotani K. et al., 2010, Reyes Leó-Cachón RB. et al., 2012*). Biotransformace tamoxifenu na jeho aktivní metabolity je z větší části zprostředkována enzymy z rodiny cytochromů CYP450 a vznikají při ní produkty, které jsou schopny efektivněji působit na ER. Mezi tyto patří majoritní produkt (90 %) biotransformace tamoxifenu N-desmetyltamoxifen, vznikající enzymatickou přeměnou převážně zprostředkovanou CYP3A4/5 a CYP2D6, a minoritní 4-OH-tamoxifen (afimoxifenu), vznikající převážně působením CYP2D6. Oba tyto primární metabolity jsou dále prostřednictvím CYP2D6 (N-desmetyltamoxifen) a CYP3A4 (4-OH-tamoxifen) metabolizovány na 4-OH-N-desmetyltamoxifen (endoxifen) (*Jordan VC. et al., 1977, Johnson MD. et al., 2004, Del Re M. et al., 2012*). Antiestrogenní aktivita, ve smyslu suprese estrogendependentní buněčné proliferace, schopnosti vazby na ER a modulace estrogenem zprostředkované genové exprese, je ve skutečnosti u endoxifenu i N-desmetyltamoxifenu srovnatelná, ale tyto látky se vzájemně liší svou koncentrací v séru – endoxifen má cca 10x vyšší sérovou hladinu než N-desmetyltamoxifenu. Proto je za klíčový aktivní metabolit tamoxifenu považován endoxifen (*Johnsson MD. et al., 2004, Lim YC. et al., 2005, Lim YC. et al., 2006*). Endoxifen navíc redukuje hladiny α -podjednotky ER, tím, že jí vede k degradaci, kdežto tamoxifen a 4-OH-tamoxifen protein ER α v nádorových buňkách karcinomu prsu stabilizují (*Wu X. et al., 2009*). Tento efekt endoxifenu je závislý na sérové koncentraci endoxifenu a nebyl pozorován u pacientů s významnou poruchou metabolismu tamoxifenu a sníženou sérovou hladinou tamoxifenu a endoxifenu (*Ferraldeschi R., Newman WG., 2010*).

Osbourne a Crewe ve svých pracích konstatují, že účinnost tamoxifenu resp. resistance na tamoxifen v terapii karcinomu prsu je dána:

- 1) nižší koncentrací tamoxifenu v nádorové tkáni v důsledku snížené exprese nebo poruchy funkce membránových transportérů (P-glykoprotein), nebo v důsledků polymorfismů a změny afinity ER k tamoxifenu a jeho metabolitům;
- 2) snížením míry přeměny tamoxifenu na jeho účinnější metabolity: 4-hydroxy-N-desmetyltamoxifen (endoxifen) a 4-hydroxytamoxifen v důsledků polymorfismů příslušných genů respektive iatrogenním zásahem, který povede ke snížení této přeměny. Jedná se o polymorfismy event. iatrogenní ovlivnění enzymů 4-hydroxylace (hlavně CYP2D6, méně CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4,

CYP1A1 a CYP3A4), nebo N-desmethylace (převážně CYP3A4, CYP1A1 a 1A2, ale i další CYP1B1, CYP2B6, CYP 2C9, CYP2C19 a CYP3A5);

- 3) Izomerací, tj. poměrem cis / trans 4-hydroxytamoxifenu, kterou katalyzuje hlavně CYP1B1, dochází k přeměně potentního *trans*-antiestrogenu na méně účinný *cis*-antiestrogen. Minoritně na izomerizaci participují další enzymy – CYP2B6 a jiné. Předpokládá se, že tato reakce může být jedním z důvodů rezistence nádorové tkáně karcinomu prsu na tamoxifen. (Osborne CK. *et al.*, 1992, Crewe KH. *et al.*, 1997).

Metabolity tamoxifenu jsou inaktivovány a posléze eliminovány konjugací pomocí sulfotransferáz, nebo glukuronidací pomocí UDP-glukuronyltransferáz např. UGT1A8, UGT1A10, UGT2B7, UGT2B15 a UGT2B17 ve II. fázi eliminačních reakcí. Tvorba sulfátů tamoxifenu a endoxifenu je zprostředkována sulfotransferázami (SULTs) SULT1A1, SULT1E1 a SULT2A1 (Falany JL. *et al.*, 2006, Brauch H. *et al.*, 2009). Sulfotransferáza 1A1 je považována za základní sulfotransferázu, která se podílí na eliminaci tamoxifenu a endoxifenu (Nowell S., Falany CN., 2006). Polymorfismům eliminačních enzymů se, opět se spornými výsledky, věnovalo několik studií (Nowell S. *et al.*, 2002, Jin Y. *et al.*, 2005, Nowell S. *et al.*, 2005, Wegman P. *et al.*, 2007). Nowellova studie prokazuje, že u pacientů s genotypem *UGT2B15*1/*2* nebo *UGT2B15*2/*2*, stejně jako u pacientů s polymorfismem *SULT1A1*2/*2*, bylo zaznamenáno signifikantní zkrácení pětiletého intervalu bez nemoci (DFS) (Nowell S. *et al.*, 2005). Ostatní studie však souvislost neprokázaly. Z rodiny UGT enzymů, které se účastní glukuronidace 4-hydroxytamoxifenu a endoxifenu jsou nejznámější UGT1A4, UGT2B15, UGT1A8, UGT1A10 (Nishiyama T. *et al.*, 2002, Ogura K. *et al.*, 2006, Sun D. *et al.*, 2007). Endoxifen je predominantně glukuronidovaný pomocí UGT1A8 a UGT1A10 na O-glukuronid. Na rozdíl od svých hydroxylovaných metabolitů, je samotný tamoxifen konjugovaný pomocí UGT1A4 na N- glukuronid, zatímco endoxifen je pomocí UGT1A4 glukuronidovaný ve své aminoskupině a tvoří 4-hydroxytamoxifen-N-glukuronid (Kaku T. *et al.*, 2004, Sun D. *et al.*, 2006, Brauch H. *et al.*, 2009). O souvislostech vlivu polymorfismů těchto enzymů na metabolismus a výsledek terapie tamoxifenem bude podejráno v následujících kapitolách, stejně jako o vlivu dalších faktorů, které se podílejí na účinnosti tamoxifenu a jeho metabolitů v organismu (OATP1B1 a ER).

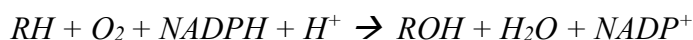
1.2.2 Cytochrom P450 a jeho role v biotransformaci a efektivitě terapie tamoxifenem

Bílkoviny ze skupiny cytochromů P450 (CYP450) patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek tzv. xenobiotik v organismu. Sloučeniny, které jsou substráty těchto hemových enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, čímž je usnadněna jejich eliminace z organismu a nedochází k jejich kumulaci. Kromě detoxikace těchto sloučenin může v průběhu transformace docházet i ke vzniku aktivnějších metabolitů, v tomto případě má primární sloučenina přiváděná do organismu roli proléčiva („prodrug“) (*Stiborová P. et al., 1999*). Cytochrom P450 je zodpovědný za reakce I. fáze biotransformace chemických látek. Jsou to enzymy, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv, environmentálních chemikálií, ale i látek přírodních a endogenních. Následná, II. fáze biotransformačních reakcí, pak vede ke konjugaci umožňující vylučování substrátu z organismu (*Rendic S., DiCarlo FJ., 1997*).

Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují především v játrech, ale působí i v jiných orgánech (plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinách). V buňkách se vyskytují hlavně v membránách hladkého endoplasmatického retikula a v membránách mitochondrií. Mitochondriální cytochromy P450 se účastní především syntézy endogenních molekul (cholesterolu, prostaglandinů, steroidních hormonů a podobně), zatímco cytochromy endoplasmatického retikula jsou významné při biotransformaci xenobiotik a léčiv (*Anzenbacher P., Anzenbacherová E., 2001*).

Chemicky patří molekuly cytochromu P450 mezi hemoproteiny, ve kterých je porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) vázán částečně hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, čímž jsou umožněny jeho speciální katalytické a spektrální vlastnosti (posun absorpčního pásu hemu). Na centrální hemové železo (Fe^{3+}) jsou v porfyrinovém skeletu navázány 4 atomy dusíku, pátým ligandem je anion síry pocházející z aminokyseliny cysteinu v aktivním místě enzymu, který je zodpovědný za specifickou schopnost tohoto hemového proteinu absorbovat UV záření o vlnové délce 450 nm po redukci hemového železa a vazbě oxidu uhelnatého (CO) na hem. Šestým ligandem, který se váže na hemové jádro, je atom kyslíku molekuly vody (*Stiborová P. et al, 1999, Nelson DR., 1999*).

Enzymy z nadrodiny Cytochromů fungují jako terminální oxidázy v řetězci reakcí zprostředkovaných mikrozomálními monoxidázami se smíšenou funkcí (MFO- mixed function oxidases). Jedná se o sled reakcí, při kterých spolupůsobí další kofaktory, např. NADPH, FAD, FMN, cytochrom P450 oxidoreduktázy a jiné (*Guengerich FP., Johnson WW, 1997*). Prvním krokem je přenos elektronů z NADPH na NADPH-reduktázu v endoplasmatickém retikulu, nebo na ferredoxin reduktázu a nehemový Fe-S protein mitochondrií. Následně dochází k přenosu elektronu na vlastní enzymy z rodiny CYP450. Redukovaný P450 dále aktivuje molekulu kyslíku (rovněž mohou jako donory kyslíku sloužit peroxidy nebo peroxokyseliny), což vede k inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a druhého do molekuly vody. Souhrnně lze tuto reakci vyjádřit takto:



Zdroj: (Coon MJ. et al., 1992, Stiborová P. et al., 1999)

V současnosti je známo více než 500 enzymů cytochromu P450, které jsou řazeny do rodin a podrodin podle stupně homologie primární struktury proteinových molekul (pořadí aminokyselin). Cytochromy mají předdefinovanou nomenklaturu: do rodin (1. číslo za zkratkou CYP450) jsou zařazovány cytochromy s homologií aminokyselin (AMK) více než 40 %, dále jsou rozřazovány do podrodin (velké písmeno na CYP450 za číslem příslušné rodiny) s homologií pořadí AMK více než 60 %. Za velkým písmenem, označujícím podrodinu následuje číslo, které označuje příslušný izoenzym. Ze známých 74 rodin cytochromů P450, tvoří savčí cytochromy celkem 14 rodin s 26 podrodinami, z kterých se 20 podrodin vyskytuje v lidském genomu (*Nelson DR. et al., 1993, Gonzales FJ., Korzekwa KR., 1995*).

Význam jednotlivých cytochromů P450 lze posuzovat z několika hledisek. Jedním z důležitých pohledů je jejich podíl na metabolismu cizorodých látek. Za 70 – 80 % všech detoxikačních reakcí fáze I jsou odpovědné cytochromy rodin 1 – 3 (CYP1, CYP2, CYP3) (*Bertz RJ., Granneman GR., 1997*). Z jaterních cytochromů P450 především tyto enzymy: 1A2, 2A6, 2D6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2E1, 3A4, z mimojaterních (ledviny, plíce, kůže, gastrointestinální trakt, urotrakt) jsou v detoxikaci xenobiotik efektivní 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4 a 3A5 (*Hakkola J. et al, 1996*).

Nejvíce zastoupeným cytochromem P450 celkově je CYP3A4 a enzymy podrodiny 2C, a dále 1A2 a 2E1. Cytochromy zaměřené na metabolismus endogenních látek jsou více

substrátově specifické. Hlavními podrodinami, které se účastní biosyntézy steroidních hormonů, jsou cytochromy z podrodin 11, 17, 19, 21, zatímco na metabolismu tromboxanů, cholesterolu, prostaglandinů vitamínu D3 a žlučových kyselin participují převážně cytochromy z podrodin 5, 7, 8, 24, 27 a 51 (Nelson DR., 1993, Guengerich FP., Johnson WW, 1997, Stiborová P. et al., 1999). Množství cytochromů je ovlivněno jednak věkem a environmentálními faktory (faktory prostředí – výskyt induktorů ve stravě a vzduchu, kouření a jiné), a jednak faktory genetickými – polymorfismy a jejich interindividuální a rasovou variabilitou. Většina enzymů cytochromu P450 jsou jak konstitutivní, tak inducibilní, což znamená, že v určité tkáni resp. buňce existuje určitá trvalá a standardní koncentrace těchto enzymů, ale v případě výskytu i minimálního množství indukčních faktorů, dochází k několikanásobnému zvýšení koncentrace příslušného cytochromu. Příkladem je 100násobné zvýšení CYP2D6 indukcí barbituráty, nebo až 30násobné zvýšení obsahu CYP3A4 v případě výskytu barbiturátů, dexametasonu nebo rifampicinu (Ioannides C., Parke DV., 1993, Gonzales FJ., Korzekwa KR., 1995).

Dalším podstatným faktorem, který se podílí na variabilitě funkce jednotlivých cytochromů, jsou polymorfismy jejich genů. Polymorfismus označuje stav, kdy změny DNA vedou k absenci, nebo nemožnosti indukce cytochromů P450, nebo ke tvorbě formy enzymu se sníženou nebo chybějící katalytickou aktivitou enzymu (Stiborová P. et al., 1999).

1.2.2.1 CYP2D6

CYP2D6 je predominantně exprimován v játrech a je součástí enzymových systémů, které se účastní metabolismu velkého množství běžně užívaných léčiv – např. antidepresiv, antiarytmik, antipsychotik, betablokátorů apod. (Zanger UM. et al., 2008).

Gen CYP2D6 je vysoce polymorfní a vykazuje velkou interindividuální a interetnickou variabilitu. Je známo více než 100 alelických variant a jejich fenotypické projevy mohou vést ke změně enzymatické aktivity CYP2D6. Dle kombinací funkčních a variantních alel rozlišujeme: pomalé metabolizéry (PM) s dvěma nefunkčními alelami CYP2D6, dále střední metabolizéry (IM resp. hetIM) s jednou funkční a jednou variantní alelou a rychlé metabolizéry (EM) s oběma funkčními alelami CYP2D6*1/*1. Pacienti s více než dvěma funkčními alelami jsou pak označováni jako ultrarychlí metabolizéři (UrM) (Bradford LD., 2002, Ingelman-Sundberg M., 2005, Schroth W. et al., 2009).

Přibližně 5 – 10 % příslušníků evropské rasy má fenotyp PM pro CYP2D6 s kompletním enzymovým deficitem, a asi 40 % populace tvoří IM, kteří vykazují parciálně sníženou enzymovou aktivitu CYP2D6. Zvýšená aktivita CYP2D6 vycházející z duplikace genů *CYP2D6* – tzv. UrM byla zaznamenána u cca 3 % evropské populace. (Zanger UM. et al., 2004, Buzkova H. et al., 2008; Kirchheiner J., 2008).

Velkou rasovou variabilitu charakterizuje spektrum variantních alel (vt), které způsobují deficitní fenotyp. Nejčastějšími variantními alelami v evropské populaci je *CYP2D6*4* (1934G > A) u 12 – 21 % populace, dále je to *CYP2D6*3* (rs35742686) a *CYP2D6*5* (delece celého genu) u 2 – 7 % různých populací. V asijské populaci je suverénně nejčastější variantní alelou *CYP2D6*10* (rs1065852), která se, dle dostupných údajů, vyskytuje až u 50 % populace. Mezi africkou a afroamerickou populací se nejčastěji vyskytuje variantní alela *CYP2D6*17* (rs28371706) s frekvencí 20 – 35 % (Rodriguez-Antona C., Ingelman-Sunberg M., 2006, Lynch T., Price A., 2007, Tan SH. et al., 2008, Ferraldeschi R., Newman WG., 2010).

V posledních letech bylo publikováno několik studií, které potvrzují přínos testování polymorfismů *CYP2D6* na efekt terapie tamoxifenem a zhruba srovnatelné množství studií, které tento význam nepotvrdily. Většina těchto studií je retrospektivních, a srovnání je obtížné, protože sledují různé spektrum variantních alel a mají různě stanovené primární a sekundární výstupy (DFS, RR, RFS, OS). V **Tab. 1** je přehled nejvýznamnějších tzv. „pozitivních studií“, které potvrzují snížení efektivity terapie tamoxifenem u karcinomu prsu na podkladě polymorfismů *CYP2D6*.

Tab. 1: Přehled tzv. „pozitivních klinických studií“

<i>Autor</i>	Pacienti N- počet Jiné	Země	CYP2D6 alely	ko-med. ev jiné	Srovnání a hodnocení	Hlavní výsledky
<i>Jin et.al 2005</i>	80	USA	*3, *4, * 5, *6	Ano	Plasmatické hladiny endoxifenu u PM, IM, EM a ko-med. inhibitory	PM 20nM, IM- 43 nM, EM- 78nM (P=0.003) Snížení hladin u ko-med. inhibitory (p=0.0025)
<i>Goetz et al 2005</i>	190	USA	*4, *6	Ne	PM vs. EM+hetEM	DFS HR1,86;p=0.089 RFS HR1.85;p=0.176 OS HR 1.12;p=0.780
<i>Lim et.al, 2007</i>	202	Asie	*10	Ne	PM vs EM a hetEM Sledování hladin metabolitů TMX v 8. týdnu terapie	Kratší TTP u PM (P= 0.032) a nižší hladina akt. metabolitů
<i>Goetz et al 2007</i>	190	USA	*4, *6	Ano	PM vs. EM+IM+ hetEM	RFS HR1.74;p=0.017 TTBR HR1.9;p=0.034 DFS HR1.60;p=0.027 OS HR1.34;p=0.223 PM- vyšší výskyt NÚ (návalů)
<i>Schroth et al 2007</i>	206	Germ	*4, *5, *10, *41	Ne	hetEM+IM+ PM vs. PM	RFT HR 2.24;p=0.02 EFS HR 1.89;p=0.02
<i>Goetz et al 2007</i>	190	USA	*3, *4, *6, *10, *17, *41	Ano	PM vs EM	TTR HR 4.0,p=0.001 DFS HR 2.0,p=0.02

<i>Wu et.al 2009</i>	293 Prospektivní	Asie	*10	Ne	PM vs. EM + hetEM (IM)	DFS HR 4.7; p = 0.04 v rameni s tamoxifenem
<i>Schroth et al 2009</i>	1 325 ER+ Pouze TAM	Němec., USA	*10, *41 ev. absence *3, *4, *5	Ne	hetEM+IM vs. PM PM+hetEM vs EM	RR HR 1,40;p=0.02 EFS HR 1.33;p=0.02 DFS HR 1.29;p=0.02 Bez OS benefitu
<i>Bijl et al 2009</i>	85 Adj TAM	Dánsko	*4	Ano	PM vs. EM	BCM HR- 4.0; p=0.025
<i>Kiyotani et al 2010</i>	282	Asie	*4, *5, *6, *10, *14, *18, *21, *36, *41	Ne	IM+PM vs. EM	RFS HR 9.52 p = 0.00036
<i>Teh et.al 2012</i>	95	Asie	*10	Ne ABCB1 exon26	PM a hetEM vs EM CC- C3435T/C EM+ CC(wt/wt) exon26	RR HR-13.4, p=0.004 RR p=0.002 Prodlužuje RR na 48 M vs 12M
<i>Demordaran et.al. 2012</i>	141	Indie	*1, *2, *4, *5, *10	Ano	hetEM+PM vs EM	RR HR-12.37 p=0.001 RFS HR-7.15, p=0.001
<i>Province MA et al 2013</i>	4 973	Evropa USA Asie Arabia	4, *5, *6, *10, *14, *18, *21, *36, *41	Ne	Metaanalýza	IDFS HR 1.25, p=0.009 Pouze za dodržení striktních inclusion kritérií

<i>Saladores et al.</i> 2014	587	Evropa USA Asie, Arabie	*3,*4,*5,* 6,*9,*10,* 41	Ne CYP2C9 CYP2C19 CYP3A5+hl adiny endoxifenu	EM vs IM+PM Endoxifen pod 14uM	DRFS: HR-0.62, p=0.013 DRFS:HR- 1.94 p=0.064, koreluje s PM
<i>Yazdi et.al</i> 2015	101	Iran	*4	Ne + další korelace	Korelace EM,PM na stadium, menop.status a Her2/neu	Pokles RR u EM+ Her2neu Bez změny u stadia III a stavu menopauzy
<i>Lei L et al,</i> 2016	72	Čína	*10	Ne +korelace na stadium a G	PM má nižší koncentraci endoxifenu v séru než EM+IM	Premenopauzální PM – zkrácení DFS a OS (p=0.01), velikost tumoru nad 2cm a G -nezávislý prognostický faktor DFS

Zdroj: (upraveno podle: Ferraldeschi R., Newman WG., 2010 s doplněním dalších studií autorkou)

Vysvětlivky: pts – pacientky, TAM – adjuvantní tamoxifen, BRCA – dědičný karcinom prsu, BCM – mortalita na Ca prsu (Breast cancer mortality), BCS – přežití u Ca prsu (Breast cancer survival), DFS – interval bez nemoci (Disease-free survival), DRFS – interval bez vzdáleného relapsu nemoci (Distant recurrence free survival), G – grade tumoru, IDFS – čas bez invazivního onemocnění, EFS – interval do objevení události (Event-free survival), DRFS – čas do objevení vzdáleného návratu nemoci (Distant recurrence-free survival), PFS – přežití bez progresu (Progression-free survival), RFS – doba bez relapsu onemocnění (Relaps-free survival), TTBR – čas do návratu karcinomu prsu (Time to breast recurrence), TTR – čas do návratu onemocnění (Time to recurrence), RFT – čas bez relapsu (Relaps-free time), OS – průměrné přežití (overall survival), HR – adjusted Hazard ratio, p – P-value.

Jin a kolektiv potvrdili na relativně nízkém počtu pacientek v roce 2005 v USA, že polymorfismy *CYP2D6* korelují s plasmatickými hladinami endoxifenu, tj. průměrné plasmatické hladiny endoxifenu u PM je méně než 20nM, u IM se pohybuje kolem 43 nM a u EM je evidentně vyšší a pohybuje se kolem 78 nM) (Jin Y. et al., 2005). Obdobné zjištění na asijské populaci prokázali Lim a Kiyotani o několik let později, a to že PM fenotyp má prokazatelně nižší hladiny endoxifenu v plasmě a statisticky významně zkrácený čas do relapsu onemocnění RFS (Lim HS. et al., 2007, Kiyotani K. et al., 2010). Goetz v několika publikovaných studiích prokázal statisticky významné zkrácení DFS, RFS a TTR u PM fenotypu ve srovnání s EM a hetEM /IM fenotypy, ale s velmi sporným vlivem na OS, který se se statistickou signifikancí podařilo prokázat až při srovnání pouze

fenotypu PM s EM ($p = 0.002$) ve studii publikované v roce 2008. Dalším přínosem jejich práce byl prokazatelně vyšší výskyt nežádoucích účinků terapie tamoxifenem (návalů) u pacientek s PM fenotypem (Goetz MP. et al., 2005, Goetz MP. et al., 2007). Další studie různých autorů prokázali rovněž signifikantně horší klinické výsledky terapie tamoxifenem ve smyslu zkrácení RR, RFS, DFS, TTP, EFS respektive OS pro nosičky variantních alel v různých populacích (Scroth W. et al., 2007, Wu X. et al., 2009, Scroth W. et al., 2009, Stingl JC. et al., 2010, Teh LK. et al., 2012, Demordan SE. et al., 2012). V roce 2008 byly publikovány výsledky studie BIG-1-98, ve které byl vytvořen statistický model predikující přežití jednotlivých podskupin postmenopauzálních pacientek na hormonální terapii tamoxifenem ve srovnání se skupinou na adjuvantní terapii letrozolem. Model naznačuje, že pětileté DFS pacientek s EM fenotypem na terapii tamoxifenem je srovnatelné ev. lepší a v parametru cena – efektivita jistě výhodnější než hormonální terapie IA (Punglia RS. et al., 2008). Provinceho metaanalýzu 12 studií s 4 973 pacientkami jsem popsala blíže v Úvodu, proto jen stručně shrnu, že výsledky metaanalýzy prokazují u postmenopauzálních pacientek, u kterých byly přísně dodrženy vstupní kritéria, významné zkrácení doby bez invazivního onemocnění (IDFS, HR 1,25, $p = 0,009$) (Province MA et al., 2013). V roce 2015 publikoval Saladores výzkum, který probíhal multicentricky v různých zemích a mezi 600 zařazených pacientek patřily příslušníčky evropské, americké a afroamerické, ásijské i arabské rasy. Rovněž spektrum sledovaných variantních alel bylo široké – *CYP2D6* *3, *4, *5, *6, *9, *10, *41, *CYP2C9* *2, *3, *17, *CYP2C19* *2, *3 a *CYP3A5* *3, navíc byly sledované i hladiny endoxifenu v průběhu terapie tamoxifenem. Z výsledků bylo zřejmé významné zkrácení doby do návratu onemocnění v podobě (DRFS – distance recurrence free survival) u nosiček PM fenotypu ($p = 0.013$) a korelace snížené hladiny endoxifenu při PM fenotypu se zkrácením DRFS ($p = 0.0064$) (Saladores P. et al., 2015). Další zajímavé výsledky přinesla nedávno publikovaná iránská studie, která na 101 pacientkách s karcinomem prsu léčených tamoxifenem sledovala vzájemný vliv stádia onemocnění, stavu menopauzy, Her2/neu positivity a *CYP2D6* polymorfismů. Tato studie prokázala významné snížení rizika návratu onemocnění (RR) u Her2/neu pozitivních pacientek s EM fenotypem *CYP2D6* léčených tamoxifenem (Yazdi MF. et al., 2015). Malá čínská studie publikovaná v 2016 prokazuje nižší koncentraci aktivních metabolitů tamoxifenu v séru u PM ($p = 0.01$) a prokazuje roli velikosti tumoru (nad 2cm) a gradu nádoru jako nezávislého prognostického faktoru pro dobu bez nemoci (DFS), ale bez ovlivnění celkového přežití (OS) (Lei L. et al., 2016).

Paralelně s množstvím literárních důkazů o signifikantním efektu polymorfismů *CYP2D6* na účinnost terapie tamoxifenem se vyskytují i studie, které tento vliv nepotvrzují a nepodporují jejich rutinní testování (tzv. „negativní studie“). Opět pro přehlednost v tabelární formě (**Tab. 2**).

Tab. 2: Přehled tzv „negativních klinických studií“

<i>Autor</i>	Pacienti N- počet Jiné	Země	CYP2D6 al ely	ko-med. ev jiné	Srovnání a hodnocení	Hlavní výsledky
<i>Wegemanee t.al. 2005</i>	677	Švédsko	*4	Ne <i>CYP3A5</i> *3 <i>UGT2B</i> *15 <i>SULT1A1</i> *2	<i>CYP2D6</i> , <i>UGT2B15</i> S <i>ULT1A1</i> <i>CYP3A5</i>	Bez benefitu RFS HR-0.13, p=0.03
<i>Nowell et.al.2005</i>	162	USA	*3, *4, *6	Ne <i>UGT2B15</i> a <i>SULT1A1</i>		Bez OS benefitu
<i>Newman et al 2008</i>	85 BRCA+ ER+, TAM +/- CHT	UK	*3, *4, *5, *41	Ano	PM vs. EM+IM/ hetEM	TTR HR2.1;p=0.14 OS HR2.5,p=0.17 BRCA+ pts TTR HR 3.8;p=0.083
<i>Abraham et.al 2010</i>	3 155	Evropa	*1, *4, *5, *6b/c, *9, *10, *41, *UM	Ne	Vliv na OS	Pouze u <i>CYP2D6</i> *6- OS HR-1.95,p = 0.02 Bez vlivu na OS u ostatních polymorfismů
<i>Thompson et.al 2011</i>	618	UK	*4, *5, *10, *41	Ano	PM+hetEM vs EM	RR HR-1.94, p=0.04 RFS HR-1.52, p=0.06 Bez vlivu komedikace

Lash et.al. 2011	11 251	Dánsko	*4	Ne	EM vs PM	RR HR-0.99 RR HR-1.4
Rae et al. 2012	615 (TM X) N-1203 (I A)	UK	*1, *2, *3, *4 , *6, *10, *41	Ne UGT2B7	PM vs EM	RR HR-1.25, p=0.64 Bez benefitu UGT2B7 polymorfism ů u IA
Sestak et.al 2012	269	UK	*4	Ne + sledování NÚ dle polymorf.	Korelace EM,PM,het EM na stadium, menopauzu Her2/neu	Pokles RR u EM+ Her2neu Bez změny u stadia III a stavu menopauzy
Regan et.al. 2012	4 393 postmeno pausal	UK	*2, *4, *5, *7 , *10, *17, *4 1	Ne NÚ -návaly	EM v.s IM+PM Návaly: EM vs PM a IM	RR HR-0.86 HR 1.24 a HR-1.23
Zhang X. et al.,201 5	296	Čína	*10 OATP1B1	Ne	EM v.s.IM+PM	OS (p= 0.096) 5y a 10y OS pro OATP1B p = 0.034

Zdroj: (upraveno podle: Ferraldeschi R., Newman WG., 2010 s doplněním dalších studií autorkou)

Vysvětlivky: pts – pacientky, CHT – chemoterapie, Ger – Německo, Jap – Japonsko, UK – Anglie, ER+ – pozitivita estrogenových receptorů, adj.TAM – adjuvantní tamoxifen, BRCA – dědičný karcinom prsu, BCM – mortalita na Ca prsu (Breast cancer mortality), BCS – přežití u Ca prsu (Breast cancer survival), IA – inhibitory aromatázy, TMX – tamoxifen, UGT2B7 – UDP-glukuronyltransferáza 2B7, DFS- interval bez nemoci (Disease-free survival), DRFS – interval bez vzdáleného relapsu nemoci (Distant recurrence free survival), EFS – interval do objevení události (Event-free survival), DRFS – čas do objevení vzdáleného návratu nemoci (Distant recurrence-free survival), PFS – přežití bez progresu (Progression-free survival), RFS – doba bez relapsu onemocnění (Relaps-free survival), TTBR – čas do návratu karcinomu prsu (Time to breast recurrence), TTR – čas do návratu onemocnění (Time to recurrence), RF - čas bez relapsu (Relaps-free time), OS – průměrné přežití (overall survival), HR – adjusted Hazard ratio, p - P-value, 5yOS a 10yOS – pětileté a desetileté přežití, OATP1B1 – organický anionový transportní protein B1.

Autorské kolektivy Wegemana a Nowella publikovali v roce 2005 studie, ve kterých neprokazují, že by u pacientek s minimálně jednou variantní alelou *CYP2D6**4 nebo *3 a *6, které podstupují pětiletou adjuvantní terapii tamoxifenem, byl DFS, RR resp OS horší ve srovnání s pacientkami fenotypu EM (Wegeman P. et al., 2005, Nowell SA. et al, 2005). Newmanova studie v roce 2008, která zkoumala vliv

CYP2D6 polymorfismů na výsledek terapie u 85 BRCA pozitivních pacientek (Breast Related Cancer – pacientky s dědičnou formou karcinomu prsu a ovárií a s vyšším celoživotním rizikem dalších nádorů), rovněž neprokázala vliv variantních polymorfismů na čas do progresu onemocnění (TTP) resp. celkové přežití (OS) (Newman P. et al., 2008). Další negativní výsledky přinesly robustní studie Abrahama (3155 pacientek) a Lasha (11251 pacientek), z kterých nevyplývá vyšší riziko návratu onemocnění (RR) u pacientek s PM fenotypem a jediný negativní vliv na OS dosahující signifikance prokázala v Abrahámově studii přítomnost variantní alely *CYP2D6**6 ($P=0.02$) (Abraham JE. et al., 2010, Lash TL. et al., 2011). Thompson v roce 2011 prokázal ve studii s 618 pacientkami, které byly léčené adjuvantní terapií tamoxifenem, že pacientky se sníženou funkcí *CYP2D6* na podkladě variantních alel *CYP2D6* *4, *5, *10 a *41 neměly signifikantně horší čas do návratu onemocnění (RFS) (HR 1,52), navíc neprokázal vliv ko-medikace inhibitory *CYP2D6* na efekt terapie tamoxifenem (Thompson AM. et al., 2011). V roce 2012 byly publikovány další zajímavé práce. Anglické výzkumné týmy pod vedením Rae a Regana vyšetřovali opět na relativně objemných souborech pacientek ($n = 615$ a 4393) různé polymorfismy *CYP2D6* a jejich vliv na riziko návratu onemocnění, opět bez průkazu signifikantně vyššího rizika návratu onemocnění (RR) u nosiček variantních alel. Navíc nebyl v Raeho studii prokázán ani vliv polymorfismů *UGT2B7* na výsledek terapie inhibitory aromatáz a v Reganově studii nebyl zaznamenán statisticky významný výskyt návalů u pacientek s variantními alelami *CYP2D6* (Rae JM. et al., 2012, Regan MM. et al., 2012). V roce 2015 publikovali dánští autoři rozsáhlé review, ve kterém hodnotili výsledky 48 aktuálních studií, které zkoumaly polymorfismy *CYP2D6*, *CYP2B6*, *CYP2C9* a *CYP2C19* na farmakokinetiku a farmakodynamiku tamoxifenu. Ve výsledku opět nebyl prokázán vliv polymorfismů žádného z těchto enzymů na farmakokinetické ani farmakodynamické parametry (de Vries Schultink AHM. Et al., 2015). V nejnovější prospektivní studii Zembutsu a spol. na 297 ER-pozitivních pacientkách, které předoperačně 14 – 28 dní dostávaly tamoxifen, sice nepotvrdili souvislost mezi přítomností variantních alel *CYP2D6* a dopadem terapie tamoxifenem nebo výskytem návalů při terapii tamoxifenem, ale byla potvrzena statisticky významná souvislost variantního fenotypu *CYP2D6* na expresi Ki67 jako určitého prediktoru terapie tamoxifenem a jasného prognostického parametru. Timto stojí tato studie na pomezí pozitivních a negativních studií a vnáší do problematiky nový úhel pohledu (Zembutsu H. et al., 2016).

Vliv **ko-medikace inhibitory CYP2D6**, u kterých se předpokládá iatrogenní vliv na funkci CYP2D6, byl rovněž zkoumán mnohými autory. Tato farmaka jsou často indikována ke zmírnění návalů a deprese, které jsou u pacientky na hormonální terapii relativně časté – uvádí se, že depresemi trpí asi 25 % pacientek a návaly až 75% (*Loprinzi CL. et al., 2002, Kimmick GG. et al., 2006, Loprinzi CL., et al., 2009, MacLeod et al., 2016*). Velká část studií, které se věnovaly výzkumu polymorfismů CYP2D6 při terapii tamoxifenem u žen s karcinomem prsu, měla jako jeden z výstupných bodů vliv ko-medikace, většinou inhibitory CYP2D6. Jin a jeho výzkumný kolektiv v roce 2005 demonstrovali, že ko-medikace paroxetinem při adjuvantní terapii tamoxifenem vede u pacientek s EM fenotypem ke zhoršení výsledků terapie, který je srovnatelný s výsledky terapie u pacientek s PM fenotypem – tj. dochází ke snížení plasmatické koncentrace endoxifenu u EM pacientek na úroveň plasmatické koncentrace endoxifenu pozorované u PM genotypu (redukce cca o 58 % – z 91 nM na 38,6 nM) se statistickou signifikancí ($p=0.005$) (*Jin Y. et al., 2005*). Tuto konverzi EM fenotypu na PM fenotyp způsobenou iatrogenním zásahem inhibitory CYP2D6 potvrdila i Borgesova studie (*Borges S. et al., 2006*). Nedávno publikovaná studie potvrzuje 7,4krát vyšší tvorbu aktivních metabolitů tamoxifenu in vitro na myším jaterním mikrozomálním systému wt genotypů CYP2D6, která se v případě přítomnosti silných inhibitorů CYP2D6 ze skupiny SSRI snižuje na úroveň variantních fenotypů (knokautovaných myší) (*MacLeod et al., 2016*). Další studie se soustředily spíše na studium ovlivnění terapeutického efektu při ko-medikaci tamoxifenu s inhibitory respektive induktory CYP2D6. Výsledky těchto studií byly opět rozporuplné, od skupiny studií, které potvrdily statisticky významnou závislost mezi ko-medikací inhibitory/induktory CYP2D6 na RR, TTF, RFS, dokonce i na OS (tzv. „pozitivní studie“) až po srovnatelnou skupinu studií, která neguje vliv ko-medikace na efekt terapie tamoxifenem (tzv. „negativní studie“). Goetz a další zkoumali v několika pracích nejenom vliv samotných polymorfismů, ale i vliv ko-medikace inhibitory CYP2D6. V závěrech těchto se mimo jiné uvádí, že ko-medikace CYP2D6 inhibitory je nezávislým prediktivním faktorem výsledků terapie tamoxifenem u postmenopauzálních žen (*Goetz MP. et al., 2005, Goetz MP. et al., 2007, Gonzales-Santiago S. et al., 2007, Kiyotani K. et al., 2008, Bijl MJ. et al., 2009, Lammers LA et al., 2010, Lash TL. et al., 2011*). Dánská studie pod vedením Lamerse srovnávala vliv SSRI paroxetinu a jiného antidepressiva citalopramu na riziko návratu (RR) u různých polymorfismů CYP2D6. Dle rizika rekurence stanovené napříč jednotlivými fenotypy byl jasně přednostně při terapii tamoxifenem doporučen citalopram před paroxetinem (*Lammers LA*

et al., 2010). Tento výsledek je překvapivý, protože i citalopram je inhibitorem CYP2D6, a zřejmě sovisí s různou schopností jednotlivých léků indukovat respektive inhibovat CYP2D6. Jiní autoři při terapii tamoxifenem nedoporučují ko-medikaci žádných inhibitorů CYP2D6 (Holzman D., 2009). Protipólem výše uvedených prací, které jasně potvrzují signifikantní vliv ko-medikace inhibitory / induktory CYP2D6 na efekt terapie tamoxifenem, je další skupina studií, které vliv těchto léků nepotvrdily (Newman WG. *et al.*, 2008, Dezentje VO. *et al.*, 2009, Aubert RE. *et al.*, 2009, Anhern TP. *et al.*, 2009, Kelly CM. *et al.*, 2010, Thompson AM. *et al.*, 2011). Mnohé z těchto studií jsou provedeny na rozsáhlých souborech pacientů například studie Dezenjého, který u 1 962 pacientek s hormonální terapií tamoxifenem zjistil četnost terapie inhibitory / induktory CYP2D6 přibližně u 30 % pacientek, ale bez signifikantního vlivu na riziko recurence nemoci (RR) ($p = 0.69$) (Dezenje VO. *et al.*, 2009). V roce 2017 očekáváme rozsáhlou studii, která mimo jiné přinese i závěry vlivu ko-medikace interferující s aktivitou CYP2D6 na výsledek terapie tamoxifenem na souboru více než 11 000 pacientek.

Asociace polymorfismů CYP2D6 a nežádoucích účinků při terapii tamoxifenem nebyla dosud systematicky studována a dosavadní poznatky jsou víceméně sekundární výstupy některých výše zmiňovaných studií. Ve studii z roku 2005 Goetz popisuje mimo jiné i to, že střední až těžké návaly se objevují častěji u extenzivních metabolizérek (EM) než u pacientek s PM fenotypem (Goetz MP. *et al.*, 2005). Rae prezentoval na Breast Cancer Sympoziu v San Antoniu 2007 výsledky své studie na 300 pacientkách léčených tamoxifenem v adjuvantní terapii, ve které prokázal, že u pacientek s PM fenotypem je výrazně lepší snášenlivost a adherence k terapii tamoxifenem (100 %), než u pacientek s EM fenotypem, z nichž 14 % odstoupilo od terapie ev. tato byla ukončena pro nežádoucí účinky v průběhu prvního roku terapie (Rae JM. *et al.*, 2007). V roce 2008 byly publikovány retrospektivní analýzy dvou velkých studií (ATAC a WHEL), které hodnotily prediktivní hodnotu výskytu návalů a jiných nežádoucích účinků souvisejících s terapií tamoxifenem na výsledky terapie tamoxifenem ve smyslu rizika recidivy onemocnění (RR). Tyto studie nestudovaly souvislost polymorfismů a vzniku nežádoucích účinků terapie tamoxifenem. Cuzick provedl retrospektivní analýzu studie ATAC a zjistil, že ženy u kterých se v průběhu prvních 3 měsíců vyskytly návaly, měly nižší riziko návratu onemocnění ve srovnání s pacientkami, které nevykazovaly tyto nežádoucí účinky (RR: HR- 0.06, $p = 0.0001$) (Cuzick J. *et al.*, 2008). Mortimer a jeho kolektiv provedli retrospektivní analýzu studie WHEL, a po 7,3 letém sledování zjistili, že pouze u 12,9 %

pacientek, které v průběhu terapie tamoxifenem měly návaly došlo k návratu onemocnění, zatímco u pacientek bez návalů se nemoc vracela signifikantně častěji – 21 % ($p=0.01$) (Mortimer JE. et al., 2008).

Naproti tomu, se rovněž objevily studie, které souvislost polymorfismů *CYP2D6* a jejich vliv na vznik nežádoucích účinků popírají. Henry publikoval v roce 2009 studii, která potvrzuje statisticky vyšší výskyt návalů ve skupině IM ve srovnání s EM ($p=0.01$) i ve srovnání s PM ($p=0.038$), zatímco EM a PM byly stran výskytu návalů srovnatelné (Henry NL. et al., 2009). Ramón ve své malé retrospektivní studii rovněž žádnou souvislost genotypu a nežádoucích účinků neprokázal, navíc v jeho sledované skupině byl vyšší výskyt středních a významných návalů mezi PM, než u pacientek s normálním metabolickým statusem (Ramón Y. et al., 2010). Sestak ve své studii publikované v roce 2012 popřel výsledky své studie z roku 2006 a rovněž neprokázal významně vyšší výskyt návalů ve skupině EM ve srovnání s IM a PM. (Sestak I. et al., 2006, Sestak I. et al., 2012).

1.2.2.2 CYP1B1

Cytochrom P4501B1 je hem-thiolátová monooxygenáza, která je zprostředkovatelem NADPH- dependentní monooxygenace pro množství substrátů, mimo jiné i steroidní hormony (Sutter TR. et al., 1994). Dosavadní výzkumy naznačují, že cytochromy podrodiny 1B, především CYP1B1, jsou odpovědné za izomerizaci trans-formy 4-OH-tamoxifenu na cis-formu, se slabší antiestrogenovou aktivitu (Osborne CK. Et al., 1992).

Několik publikovaných studií prokázalo up-regulaci CYP1B1 v nádorové tkáni karcinomu prsu ve srovnání se zdravou tkání prsu (Murray MI. et al., 1997, Hellmold H. et al., 1998, Mc Fayden MCE. et al., 1999). Bylo identifikováno několik alelických forem *CYP1B1*. Jednou z nejznámějších variantních forem, které mění aktivitu tohoto enzymu, je změna Leu a Val v pozici 432 (polymorfismus *L432V*). Z dosavadních výsledků vyplývá, že některé substráty CYP1B1 jsou lépe metabolizovány Val variantou, zatímco jiné Leu variantou v pozici 432 (Shimada T. et al., 2000. Crewe neprokázal signifikantní závislost mezi jednotlivými alelickými variantami *CYP1B1* a schopností katalyzovat izomerizaci tamoxifenu z trans- na cis- formu a N-demetylací (Crewe KH. et al., 2002).

Další studie prokázaly souvislosti polymorfismů *CYP1B1* se zvýšeným výskytem karcinomu prsu v různých rasách a environmentálních vlivech (např. nositelé *CYP1B1* *3/*3, kteří jsou kuřáci, mají vyšší riziko karcinomu prsu ve srovnání s nekuřáky, BMI > 24 kg/m² byl rovněž asociován se zvýšeným rizikem Ca prsu u nosiček *CYP1B1**3 (*rs1056836*) alely apod.) (*Kocabas NA. et al., 2002, Saintot M. et al., 2003*). Yue v publikovaných závěrech své práce uvádí, že u pacientek, léčených tamoxifenem se karcinom prsu vyskytoval ve větší míře, než u pacientek léčených inhibitory aromataz (*Yue W. et al., 2005*). Tuto skutečnost lze, podle Brockdorffa, objasnit mírou exprese *CYP1B1* v tumorové tkáni a toxicitou ev. „tumorigenicitou“ estradiolu a jeho metabolitů (*Brockdorff BL. et al., 2000*). Jasná úloha polymorfismů *CYP1B1* u pacientek s karcinomem prsu zůstává zatím nejasná a bude vyžadovat další zkoumání (*Sissung TM. et al., 2006*).

1.2.2.3 CYP2B6

CYP2B6 katalyzuje 4-hydroxylaci a izomerizaci *trans*-4-hydroxytamoxifenu a podílí se na N-demetylacii. Přesná funkce CYP2B6 je zatím málo prozkoumána. Předpokládá se, že CYP2B6 se, společně s dalšími cytochromy, účastní 4-hydroxylace tamoxifenu a jeho přeměny na aktivní metabolity. Zanger na základě svých výzkumů v roce 2007 předpokládá, že v průběhu terapie tamoxifenem dochází k indukci CYP2B6, následné disproporci metabolitů tamoxifenu směrem k účinnější *trans*-4-OH-tamoxifenu, a posléze k následné převaze méně účinné *cis*-formy. Konečným efektem může být snížení účinku tamoxifenu. Indukce CYP2B6 může rovněž vést k tvorbě „resistentního fenotypu“ nádorových buněk. Nejčastější variantní alelou je *CYP2B6**6, která se vyskytuje s frekvencí 15 – 60 % napříč různými rasami (*Zanger UM. et al., 2007*). Lang v roce 2001 prokázal, že polymorfismy *CYP2B6*, hlavně alelické varianty *CYP2B6**5 a *7, vedou ke snížené expresi *CYP2B6* a redukci S-mefenytoin-N-demetylázové aktivity tohoto enzymu (*Lang T. et al., 2001*). V publikovaných studiích nebyla dosud nalezena žádná souvislost mezi *CYP2B6**6 a koncentracemi 4-OH-tamoxifenu, ani mezi časem do relapsu (RFT) a celkovým přežitím (OS) (*Thomas C. a Gustafson JÅ. et al., 2011, Mwinyi J. et al., 2014, De Vries Schultink et al., 2015*). Jasná souvislost mezi polymorfismy *CYP2B6* a výsledky terapie tamoxifenem nebyla dosavadními výsledky studií prokázána.

1.2.2.4 CYP2C9

Cytochromy podrodiny 2C jsou u člověka hojně zastoupeny, mají velmi širokou substrátovou specifitu a hrají velmi důležitou úlohu v metabolismu řady léčiv a v procesu karcinogeneze. Je pro ně příznačný výrazný genetický polymorfismus a jeho vliv na efektivitu terapie jejich substráty. U lidí byly identifikovány 4 formy enzymů – 2C8, 2C9, 2C18 a 2C19 (Stiborová P. et al., 1999). S ohledem na metabolismus hormonální terapie hrají důležitou úlohu hlavně CYP2C9 a CYP2C19 (Collier J. et al., 2002, Ferraldeschi R., Newman WG., 2010).

CYP2C9 se podílí na tvorbě aktivních metabolitů tamoxifenu (N-desmetyl-tamoxifenu a 4-hydroxytamoxifenu), i když v prokazatelně menší míře, než CYP2D6 a CYP3A4. Je známo více než 30 alelických variant enzymu CYP2C9, které různě ovlivňují metabolickou aktivitu enzymu – tato může být normální (*1A), snížená (*3, *5, *8, *11A, *13) nebo chybějící (*6) (De Vries Schultink AHM. Et al., 2015). Za nejdůležitější činitele variabilní míry detoxikace některých léčiv jsou označovány především polymorfismy CYP2C9*2 (rs1799853) a *3 (rs1057910) (Lee CR. et al., 2002). Obě variantní alely se vyskytují asi u 35 % evropské populace, u asijské a africké populace jsou méně časté (Garcia-Martin E. et al., 2006). Četné studie v minulosti prokázaly asociaci polymorfismů CYP2C9 s vyšším výskytem nežádoucích účinků léků, např. krvácení při terapii warfarinem, GIT krvácení po protizánětlivých lécích (NSA) a hypoglykemie po derivátech sulfonylurey (Brauch H. et al., 2009). V souvislosti s terapií tamoxifenem byl zkoumán polymorfismus CYP2C9*2 (rs1799853), který vede k substituci Arg144Cys a následné poruše interakce cytochromu P450 a NADPH-oxidoreduktázou (Crespi CL., Miler VP., 1997). Studie Tefta, Jina a Lima neprokázali žádný signifikantní vliv variantních polymorfismů na plasmatickou hladinu tamoxifenu a jeho aktivních metabolitů u polymorfismů CYP2C9*2 a *3, i když Lim prokázal signifikantní rozdíl v plasmatické hladině 4-hydroxytamoxifenu a endoxifenu mezi nosiči variantních alel CYP2C9*2 a *3 v neprospěch variantní alely *3 (Jin Y. et.al, 2005, Lim JSL et al., 2011, Teft WA. et al., 2013). V rozporu s těmito vesměs negativními závěry, Mwinyi a Schroth prokázali signifikantní rozdíl hladin obou aktivních metabolitů tamoxifenu v plasmě v souvislosti s výskytem variantních alel, ale bez zřejmého vlivu na dopad terapie tamoxifenem (Schroth W. et al., 2007, Mwinyi J. et al., 2014). Zatím tedy nebyl prokázán žádný významný vliv polymorfismů CYP2C9 na terapii tamoxifenem.

1.2.2.5 CYP2C19

Enzymy CYP1B1, CYP2B6 a CYP2C19 jsou zodpovědné za izomerizaci trans-4-hydroxytamoxifenu na její cis-formu, která má slabší estrogení aktivitu a může vést k rezistenci na léčivo. I jejich polymorfismus je pokládán za jednu z příčin velké interindividuální a interetnické variability účinku tamoxifenu (*Osborne CK. et al, 1992, Tan SH. et al., 2008*). Dále je považován za jeden z enzymů, který se podílí na účinku terapie Lapatinibem – tyrozinkinázovým inhibitorem, který se používá v terapii Her2 pozitivních karcinomů prsu. Alely *CYP2C19**2, *3, *4, *5, *6, *7 a *8 jsou známy jako tzv. “nulové alely“ a vedou k minimalizaci až deaktivaci enzymů (PM genotyp). V evropské populaci je nejfrekventovanější nulovou alelou *CYP2C19**2 (*rs4244285*). V evropské populaci je frekvence PM genotypů (homozygotů pro variantní alelu) 3 %, zatímco v oceánsko – asijské populaci 23 %. Heterozygotů pro variantní alelu je v evropské populaci 32 % (*Wedlund PJ., 2000, Desta Z. et al., 2002*). Další zajímavou studií, která se zabývala zjišťováním prognostického významu *CYP2C19**2 polymorfismu, byla studie vedená Beelem. V této autoři prokázali, že nosičky minimálně jedné variantní alely *CYP2C19**2 mají, ve srovnání s wt- homozygotkami, delší čas do návratu onemocnění (RFI, $p = 0.001$, HR 0.26) a potvrdili horší dopad nosiček této variantní alely v případě, že nedostávají tamoxifen. Tento prognostický vliv variantní alely odůvodnili tím, že méně funkční variantní *CYP2C19**2 zvyšuje expozici buněk k estrogenům, a tím potencuje nárůst nebo opětovné vzplanutí nemoci (*Beelen K. et al., 2013*). *CYP2C19**2 alely Genotyp *CYP2C19**17 (*rs12248560*) je spojený s UrM fenotypem. Schroth na souboru 206 pacientek s adjuvantní terapií tamoxifenem prokázal, že pacientky s vyšší enzymatickou aktivitou tohoto enzymu s alelou *17 mají delší dobu do návratu onemocnění (RFT – HR 0.45; 95%CI 0.21-0.92; $p=0.03$) než pacientky s jinými známými polymorfismy genu pro *CYP2C19* *1, *2 a *3. I když nebyl prokázán signifikantní vliv na přežití (OS) předpokládal, že pacientky s *CYP2C19**17 budou zvláště profitovat z terapie tamoxifenem (*Schroth W. et al., 2007*). Další studie naopak neprokázali žádný signifikantní vliv genotypu *CYP2C19* na dopad terapie tamoxifenem (*Okishiro M. et al., 2009, Mwinyi J. et al., 2014*).

1.2.2.6 CYP3A4 a 3A5

CYP3A4 a 3A5 jsou, co do zastoupení v lidských tkáních a množství metabolizovaných substrátů, celkově nejrozšířenější enzymy rodiny cytochromů

P450. Jsou přítomny v játrech, ledvinách, plicích, GIT, placentě a v dalších tkáních. Jejich silným induktorem jsou např. barbituráty a dexamethason, které mohou zvyšovat jejich aktivitu až třicetnásobně. Jejich přirozenými substráty jsou aflatoxiny, polycyklické aromatické uhlovodíky, testosteron, progesteron, kortizol a další steroidní hormony (Stiborová P. et al., 1999). Je známý jejich vliv na efektivitu některých cytostatik a léků využívaných v terapii karcinomu prsu (antracykliny, taxany, lapatinib a tamoxifen) (Tan SH. et al., 2008). CYP3A4 je navíc primárním cytochromem zodpovědným za metabolismu estrogenu a steroidních hormonů. V některých tkáních (např. prsní tkáň) se konstitutivně nenachází, pouze inducibilně (Lee AJ. et al., 2001, Oyama T. et al., 2005). Společně s CYP2D6 se velkou mírou podílí na přeměně tamoxifenu na jeho aktivní metabolity. CYP2D6 zprostředkuje přeměnu tamoxifenu na N-desmetyltamoxifen, který je majoritní produkt (90 %) úvodní přeměny tamoxifenu, zatímco CYP3A4/5 vedou minoritně ke vzniku 4-hydroxytamoxifenu. N-desmetyltamoxifen a 4-hydroxytamoxifen jsou následně prostřednictvím CYP3A4/5 metabolizovány na nejaktivnější metabolit – endoxifen (Crewe KH. et al., 2002, Stearns V. et al., 2003, Tan SH. et al., 2008, Bardia A., Stearns V., 2010).

V souvislosti s účinností terapie tamoxifenem bylo studováno několik polymorfismů. Jednou ze zkoumaných variantních alel je *CYP3A4*1B* (rs2740574), která se vyskytuje ve 35 – 67 % u afroamerické populace, ale v pouhých 2 – 9 % u evropské populace a vůbec v asijské populaci. Je spojována s výskytem gynekologických nežádoucích účinků při terapii tamoxifenem (Walker AH. et al., 1998, Lamba JK. et al., 2002). Chu publikoval v roce 2007 studii, v níž byl prokázán trojnásobný nárůst výskytu endometriálního karcinomu u pacientek léčených tamoxifenem (Chu W. et al., 2007). Další zkoumaný polymorfismus *CYP3A5*3* (rs776746) vede, dle publikovaných dat, k významnému snížení aktivity CYP3A5. Wegman publikoval v roce 2007 výsledky rozsáhlé farmakogenetické studie, ve které pozoroval, že homozygoti pro variantní *CYP3A5*3C* alelu mají signifikantně lepší čas do návratu nemoci (RFS) ve srovnání s wild – type homozygotmi a heterozygotmi (Wegman P. et al., 2007). Teft a kolektiv překvapivě potvrdili vyšší koncentrace endoxifenu a dalších metabolitů tamoxifenu u nosičů *CYP3A4*22*, i když je známo, že nosiči variantních alel *CYP3A4*22* mají nižší enzymatickou aktivitu. Tento výsledek odůvodnili snížením first-pass efektu při snížené metabolické aktivitě CYP3A4 v tenkém střevě, čím dochází ke zvýšení tamoxifenu v oběhu, a tím i elevaci koncentrace jeho metabolitů. Podle jejich výsledků, ale snížení

metabolické aktivity u *CYP3A4*22* nevede k tak významnému snížení aktivních metabolitů, jako je tomu u nosičů *CYP2D6* variantních alel, proto mají polymorfismy *CYP3A4*22* význam hlavně u PM *CYP2D6* (Teft *WA. et al.*, 2013). Další publikované studie přímou souvislost *CYP3A5* polymorfismů s výsledkem terapie tamoxifenem neprokázaly (Jin *Y. et al.*, 2005, Tucker *AN. et al.*, 2005, Goetz *MP. et al.*, 2005, De Vries *Schultink AHM et al.*, 2015).

Další důležitou funkci v hormonální terapii má *CYP3A4* v metabolismu inhibitorů aromatáz letrozolu a exemestanu (Tan *SH. et al.*, 2008).

1.2.2.7 CYP19A

Cytochromy P450 rodin 17, 19 a 21 jsou lokalizované v mikrozomech. Jsou známé svou substrátovou specifitou a specifitou účinků. Hlavní funkcí těchto rodin je udržování optimální hladiny steroidních látek v organismu. Inhibitory *CYP19* se uplatňují jako antiandrogeny při hormonální terapii karcinomu prostaty a jako inhibitory aromatáz při terapii karcinomu prsu. Jsou známé svou velkou interetnickou variabilitou.

Z publikací vyplývá, že variantní alely *CYP19* vedou, ve srovnání s wild-type genotypem, ke snížení enzymové aktivity aromatázy a k jisté rezistenci na IA, z čeho plyne předpoklad, že pacientky s polymorfismy *CYP19* budou mít menší benefit z terapie inhibitory aromatáz (Ma *CX. et al.*, 2005). Menší španělská studie s 67 pacientkami popisovala asociaci běžné *CYP19A1* variantní alely (*rs1870049*) s vyšším počtem odpovědí (RR) a delším časem do progresu (TTP) u postmenopauzálních hormonálně pozitivních pacientek s metastatickým karcinomem prsu léčených letrozolem. Jasný mechanismus, kterým variantní genotypy ovlivňují efektivitu terapie letrozolem není znám, ale předpokládá se efekt na stabilizaci mRNA ev. zvýšení transkripce (Colomer *R. et al.*, 2008).

1.2.3 P – glykoprotein

P-glykoprotein (P-gp), rovněž známý jako multidrug resistance protein 1 (MDR-1) nebo ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) nebo též CD243, je efluxní transmembránová pumpa, která hraje významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv a xenobiotik v organismu. Nadměrná exprese genu pro P-gp často vede k rezistenci organismu na podávanou terapii (*Pechhandová K. et al., 2006*).

P-gp vytváří velký transmembránový kanál, otevřený do extraplasmatického prostoru a uzavřený vůči cytoplasmě (*Rosenberg MF. et al, 1997*). Podkladem P-gp je transmembránová bílkovina 170 kDa (1280 AMK), tvořená dvěma více méně analogickými částmi -N a C- koncem, z nichž každá obsahuje šest transmembránových alfa-helix šroubovic. Tyto transmembránové části jsou v extracelulárním prostoru propojeny hydrofilními smyčkami, v cytosolu jsou C- a N- konec propojeny dvěma nukleotid-vážeckými doménami, kde dochází k hydrolýze ATP s následným uvolněním energie potřebné k transportu specificky navázaného substrátu. P-gp je strategicky exprimován především v místech důležitých pro absorpci a distribuci látek, jako jsou například hepatocyty, enterocyty jejunu a kolon, buňky pankreatu, v buňkách proximálních tubulů ledvin, ale i na místech hematoencefalické bariéry, placenty a testikulární bariéry. Neméně významná je jeho funkce v buňkách hemato-lymfatického systému, kde se předpokládá, že se účastní přenosu cytokinů, interferonů a dalších substancí s parakrinní aktivitou (*Pechhandová K. et al., 2006*).

Substráty P-gp jsou typicky hydrofobní, resp. amfifilní sloučeniny o molekulové hmotnosti 400 Da, kladně nabitě při pH 7,4, ale nejspíše jsou to i substráty neutrální (např. digoxin) nebo hydrofilní (např. metotrexát). Podmínkou je přítomnost dvou elektron-donorových skupin ve vzdálenosti $2,5 \pm 0,3$ nebo $4,6 \pm 0,6$ Å nebo tří elektron-donorových skupin s prostorovým odstupem $4,6 \pm 0,6$ Å, které mohou vytvářet vodíkové vazby. Mezi nejčastější substráty P-gp patří protinádorová léčiva (např. etoposid, docetaxel, paklitaxel, doxorubicin, epirubicin, irinotekan, mitomycin C, topotekan, vinblastin, vinkristin, tamoxifen a další), dále antiarytmika (např. digoxin, chinidin, amiodaron a pod), imunosupresiva (např. cyklosporin A, takrolimus, rapamycin), steroidní hormony (aldosteron, dexametason, estradiol, hydrokortison), antiemetika (dromperidon, ondasetron), hypolipidemika (atorvastatin, lovastatin), antibiotika (erytromycin, levofloxacin, a jiné), blokátory kalciových kanálů (diltiazem, mibefradil, verapamil,

nikardipin, apod.), H1-antihistaminika (fexofenadin, terfenadin), H2-antihistaminika (cimetidin, ranitidin), opiáty (morfium), inhibitory HIV-proteázy (indinavir, nelfinavir, seqinavir, ritonavir) a další léky (např. fenytoin, amitriptylin, losartan, kolchicin apod.) (Seelig A., 1998, Sun J et al., 2004).

Gen kódující P-gp (ABCB1, MDR-1), se nachází na 7. chromozomu (7q21). Je popsáno mnoho funkčních polymorfismů tohoto genu, především z řad bodových mutací (SNPs- Single Nukleotide Polymorphisms). První systematický screening polymorfismů (SNPs) v genu pro *ABCB1* uskutečnil a publikoval v roce 2000 Hoffmeyer a kolektiv. Ve výsledcích své studie našel 15 různých polymorfismů, z nichž 12 nemění sekvenci aminokyselin proteinu a 7 je lokalizováno v intronech. Polymorfismy v exonu 2 (*rs9282564*) a exonu 11 (*rs2229109*) vedou k záměně aminokyseliny, a mohou tak měnit funkčnost proteinu změnou náboje nebo velikostí molekuly proteinu (Hoffmeyer S. et al., 2000). Polymorfismus exonu 26 (*rs1045642*) mění intenzitu exprese P-gp v duodenu a tím ovlivňuje farmakokinetiku, zejména absorpci, typického substrátu P-gp digoxinu a dalších farmak a xenobiotik. U homozygotů pro alelu *T* byla, ve srovnání s jedinci homozygotními pro alelu *C*, zaznamenána více než dvakrát nižší exprese intestinálního P-gp s následně zvýšenými plazmatickými koncentracemi digoxinu a exponovaných léčiv v důsledku jejich rychlejší absorpce. Terminální eliminace byla srovnatelná s jedinci s alelou *C/C* (Hoffmeyer S. et al., 2000). Další analýzy *ABCB1* se zaměřily na nejčastěji se vyskytující spojení sekvenčních variant v exonu 6 s variantami v exonu 21, 12 a v intronu 6. Podobně jako v případě polymorfismů jiných genů, existují výrazné mezirasové rozdíly ve frekvenci výskytu polymorfismů *ABCB1*. Například pro *C3435T* je frekvence genotypů *C/C* a *T/T* v evropské populaci přibližně 25 %, zatímco v africké populaci je frekvence *T/T* genotypu pouze 6 % (Hoffmayer S. et al., 2000, Kim RB. et al., 2001, Johne A. et al., 2002, Sakaeda T. et al., 2003, Pechandová K. et al., 2006).

V posledním desetiletí bylo publikováno více prací, které hodnotily efektivitu a terapeutický výstup dalších léků (např. paroxetinu, antivirotik a jiných) na podkladě polymorfismů *ABCB1* genu. Některé udávají, že variantní polymorfismus v exonu 26 a 21 zvyšuje expresi a funkčnost P-gp (Kato M. et al., 2008, Vidová Z. et al., 2012). Jiné práce tento závěr nepodporují (Marzolini C. et al., 2004, Winzer R. et al., 2005).

Tamoxifen je také substrátem pro P-gp a lze se domnívat, že stejně jako pro jiné jeho substráty, mohou funkční polymorfismy *ABCB1* ovlivňovat jak hladiny tamoxifenu

a jeho metabolitů, tak efektivitu jeho terapie (*Iusuf D. et al., 2011; Teft WA. et al., 2011*). Některé studie prokazují, že zvýšená exprese tohoto membránového proteinu byla u karcinomu prsu významně asociovaná s návratem nemoci a kratším časem do návratu onemocnění (DFS). Zvýšené exprese byly detekovány u 40 – 70 % karcinomů prsu po chemoterapii a vedly ke snížení celkového přežití (OS) (*Teh LK. et al., 2012*).

Polymorfismus *rs1045642 (C3435C/T)* byl v publikovaných studiích asociován s výsledkem terapie u karcinomu prsu i dalších onemocnění (*Kafka A. et al., 2003, Kelleher D. et al., 2004*). Hoffmeyer prokázal dvounásobně vyšší expresi P-gp u wt-homozygotů ve srovnání s variantními homozygoty (*Hoffmeyer S. et al., 2000, Taheri M. et al., 2010*). Teh publikoval v roce 2012 práci, která zkoumala vztah polymorfismů *CYP2D6* a *exonu26 ABCB1* na efektivitu terapie tamoxifenem u 95 pacientek s karcinomem prsu. Z výsledků vyplývá, že u homozygotek wt alely byl zaznamenán kratší čas do návratu onemocnění (TTR). Zajímavým zjištěním bylo, že u pacientek s kombinací dvou polymorfismů – IM fenotypu *CYP2D6* a wt homozygotů v *exonu 26 ABCB1*, byla statisticky potvrzena vyšší míra rizika návratu nemoci RR ($p=0.002$) a zkrácení času do návratu nemoci (TTR) ze 48 měsíců na 12 měsíců, ve srovnání s EM fenotypem *CYP2D6* a variantním homozygotem pro exon 26. Efekt polymorfismů *exonu 26* na změnu hladin endoxifenu v séru nebyl prokázán (*Teh LK. et al., 2012*). S ohledem na sníženou expresi P-gp u *TT* homozygotů se předpokládá pomalejší odstraňování tamoxifenu a jeho metabolitů, a tudíž vyšší účinnost tamoxifenu.

Další práci, zkoumající vztahy polymorfismů *exonu 21 (rs3740065)* a *CYP2D6* při terapii tamoxifenem, publikoval v roce 2010 Kiyotani. Tato potvrdila statisticky významné zkrácení času do návratu nemoci (RFS) při výskytu minimálně jedné variantní alely *CYP2D6* ($p= 0.000036$) a variantní alely *exonu 21* ($p= 0.00017$). Byl prokázán kumulativní efekt, tj. při kumulaci vícero polymorfismů (u 4 polymorfismů je riziko rekurence 45,25násobně vyšší než v případě jednoho polymorfismu). Navíc byla u polymorfismu *exonu 21* potvrzena role nezávislého indikátoru času do návratu onemocnění (RFS) a nižší hladina endoxifenu v případě variantních alel (*Zafra-Ceres M. et al., 2014, Kiyotani K. et al., 2010*). V poslední době se pozornost soustřeďuje na výzkum současného vlivu více než jednoho polymorfismu na efekt terapie tamoxifenem. Vazby několika polymorfismů a tedy několika souběžných zásahů do metabolismu léčiva by mohly být jedním z možných vysvětlení proč výsledky vlivu jednoho polymorfismu (pouze *CYP2D6*) vykazují rozporuplné výsledky.

1.2.4 Enzymy konjugace

1.2.4.1 Sulfotransferázy (SULT)

Studii, které by sledovaly komplexní změny polymorfismů vícero složek metabolismu tamoxifenu, nebo se soustředily na mutace enzymů, které se účastní na konjugaci a vylučování tamoxifenu z organismu, je málo.

Variantní genotyp *SULT1A1**2 (*rs9282861*) byl identifikován jako možná příčina redukované enzymatické aktivity. Dvě studie neprokázaly souvislost farmakokinetiky tamoxifenu a polymorfismů *SULT1A1* (*Ismail R. et al., 2003, Jin Y. et al., 2005*). Studie se souborem 160 pacientek referovala o zvýšení rizika smrti na karcinom prsu při přítomnosti této deficitní varianty v genotypu pacientek (*Nowell S. et al., 2002*). Wegmanova studie, která zkoumala současně vliv několika polymorfismů genů pro enzymy odpovědné za metabolismus tamoxifenu (*CYP2D6, CYP3A4, SULT1A1* a *UGT2B15*). Autoři randomizovali 238 pacientek dle délky adjuvantní terapie tamoxifenem do 2 ramen – do dvou- a pěti-leté adjuvantní terapie. Z výsledků vyplývá signifikantní prodloužení času do návratu onemocnění (RFS) u nosiček *SULT1A1**1 s dvoletou adjuvancí tamoxifenem (HR – 0.33, *p*=0.04), které ale nebylo potvrzeno v rameni s pětiletou adjuvancí. Dalším významným polymorfismem, kterého nosičky měly signifikantní zlepšení RFS v obou ramenech byl *CYP3A5**3 (HR=2.84, *p*=0.0005). U polymorfismů zbylých dvou zkoumaných enzymů nebyl prokázán žádný signifikantní benefit na efekt terapie tamoxifenem (*Wegman P. et al., 2007*). V současnosti je standardem minimálně 5 let adjuvantní hormonální terapie s naléhavou tendencí tuto nadále prodlužovat na 10 a více let. Proto benefit pouze po 2 letech adjuvantní terapie nemá pro klinické využití velký význam.

1.2.4.2 UDP- glukuronyltransferázy (UGT)

Studie publikovaná Sunem a kolektivem v roce 2006 předpokládala zvýšenou eliminaci tamoxifenu, a tím zhoršení výsledků terapie tamoxifenem (zkrácení času do návratu onemocnění RFS) u nosiček variantní alely *UGT1A4**3 (*rs2011425*). Tento předpoklad nebyl výsledky potvrzen (*Sun D. et al., 2006*). Nowell a kolektiv ve studii publikované v roce 2005 studoval mimo jiné polymorfismus *UGT2B15**2 (*rs902023*) v místě domnělé vazebné domény pro substrát. Výsledky studie naznačují, že pacientky

s adjuvantní terapií tamoxifenem, které jsou nositelkami genotypu *SULT1A1**2/*2 a nebo *UGT2B15**1/*2 nebo *UGT2B15**2/*2 mají signifikantně redukované pětileté přežití (Nowell SA. et al., 2005). Romero Lorca a kolektiv publikovali v roce 2015 práci, ve které sledovali plasmatickou hladinu glukuronidových metabolitů tamoxifenu u pacientek s karcinomem prsu v souvislosti s různými polymorfismy UDP- glukuronidáz (*UGT1A4*, *UGT2B7*, *UGT2B15*, *UGT2B17*). Zjistili, že ne všechny polymorfismy mají stejný účinek na funkci jednotlivých enzymů když prokázali, že zatím co se hladina glukuronidových metabolitů tamoxifenu u variantních polymorfismů *UGT1A4* a *UGT2B7* snižuje, u polymorfismů *UGT2B15* a *2B17* se zvyšuje, a tedy lze očekávat, že nosičky variantních alel *UGT1A4* a *UGT2B7*, stejně jako wt homozygoté pro *UGT2B17* a *UGT2B15* budou kandidáty pro lepší odpověď na tamoxifen (Romero-Lorca A. et al., 2015). Všechny předešlé výsledky potřebují další ověření.

1.2.5 Vliv OATP1B1

Organický anionový transportní polypeptid 1B1 (*OATP1B1*), kódovaný “*SLCO1B1*“ genem, je hlavním jaterním transmembránovým transportním proteinem. In vitro byla prokázána zvýšená exprese *OATP1B1* na tumorových buňkách karcinomu prsu, zatím co na buňkách zdravé prsní tkáně převládala exprese *OATP2B1*, *OATP3A1* a *OATP4A1*, což vedlo k zamyšlení se nad rolí polymorfismů *OATP1B1* na efekt terapie tamoxifenem (Wlcek K et al., 2008). Asi nejzajímavější studií tohoto typu byla studie publikovaná nedávno Zhangem a kolektivem, která hodnotila asociaci polymorfismů *CYP2D6**10 a *OATP1B1* na 296 pacientkách a prokázala statisticky signifikantní vliv wild-type *OATP1B1* (*T521T*) na prodloužení pětiletého a desetiletého přežití (5yOS a 10yOS) ve srovnání s pacientkami heterozygotními (*T521C*) a variantně homozygotními (*C521C*) ($p = 0.034$) bez vlivu polymorfismů *CYP2D6* na přežití (Zhang X. et al, 2015).

1.2.6 Vliv polymorfismů estrogenového receptoru (ER)

Dalším předpokládaným mechanismem resistance na tamoxifen jsou polymorfismy genu pro estrogenový receptor (ER). Estrogenový receptor je členem rodiny intracelulárních nukleárních receptorů. Jsou známy 2 typy – ER α a β . Bylo zjištěno, že v některých orgánech se vyskytují pouze ER typu α (např. játra), v některých pouze ER

typu β (např. plíce) a v řadě orgánů se, s různým stupněm exprese a různými funkcemi, vyskytují oba podtypy ER (Jensovský J., 2002). Zatím je z hlediska významu polymorfismů více prozkoumán $ER\alpha$, zatímco role polymorfismů receptoru typu β zůstává nadále nejistá. Publikované studie naznačují, že při vzniku a vývoji karcinomu prsu, dochází v tumoru ke změně poměru $ER\alpha:ER\beta$ ve smyslu vyššího zastoupení $ER\alpha$. Zatímco $ER\alpha$ působí spíše proproliferálně a jeho vyšší výskyt je spojován spíše s agresivnějšími tumory, předpokládá se, že tumory s vyšším zastoupením ER β jsou méně agresivnější, lépe diferencované a mají menší tendenci zakládat uzlinové a vzdálené metastázy. Dokonce se v některých studiích uvádí ER β jako pozitivní prognostický faktor (Jarvinen TA. et al., 2000, Helguero LA. et al., 2005).

V souvislosti se vznikem rezistence na tamoxifen, byla v několika malých studiích zkoumána delece v exonu5 $ER\alpha$, bez prokázané souvislosti na výsledek terapie (Ferro P. et al., 2003). V několika malých, převážně asijských studiích, byl studován vztah mezi tandemovými repeticemi CA sekvencí v intronu 5 genu pro $ER\alpha$ a rizika vzniku karcinomu prsu a poklesu kostní minerální density (BMD). Bylo prokázáno, že nosičky alely $(CA)_{21}$, což je zhruba 27 % asijské populace, vykazovaly významný nárůst BMD po dvanáctiměsíční terapii tamoxifenem, a navíc u pacientek s menším počtem repeticí CA než 23 bylo pozorováno významné zvýšení rizika vzniku Ca prsu (Anghel A. et al., 2006, Del Re M. et al., 2012, Thomas C. a Gustafson JÅ. et al., 2011).

Dalšími zkoumanými polymorfismy $ER\alpha$, byly dva polymorfismy intronu1 – $ER\alpha A351G$ (rs 9340799) a $T397C$ (rs2234693) a vysoce polymorfní mikrosatelitové sekvence 5'- konce genu pro $ER\alpha$ $(GT)_n$. Dle publikovaných studií se polymorfismus $T397C$, vyskytuje v evropské populaci s frekvencí přibližně 36 % heterozygotů a zhruba 20 % homozygotů pro variantní alelu. Přítomnost variantní alely vede ke vzniku vazebního místa pro transkripční faktory B-Myb a desetinásobně zvažuje transkripci a expresi ER, a tudíž se předpokládá i vyšší účinnost SERM (Herrington DM. et al., 2002, Heilberg IP. et al., 2005, Onland-Moret NC. et al., 2005, Del Re M. et al., 2012). Naproti tomu, pro polymorfismus $A351G$ byla prokázána spojitost se změnou kostní minerálové density při terapii dalším SERM raloxifenem a vyšší riziko vývoje karcinomu prsu po menopauze (Shin A. et al, 2003, Heilberg IP. et al., 2005).

Často diskutovanou je otázka změny efektivity terapie SERM tamoxifenem vlivem epigenetických změn $ER\alpha$. Míra metylace promoteru $ER\alpha$ a deacetylace histonů, ke kterým dochází často v průběhu vývoje karcinomu prsu, můžou zvrátit vznik rezistence

na tamoxifen a v několika studiích se jeví jako silné prediktory efektivity terapie tamoxifenem (RFS, RR) (*Widschwendter M. et al., 2004, Fiegel H. et al., 2005, Giacinti L. et al, 2006, Del Re M. et al., 2012*).

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem předkládané práce bylo

- 1) Ověřit, zda u pacientek se sníženou aktivitou CYP2D6, danou variantním genotypem či výskytem inhibitorů tohoto enzymu v ko-medikaci, dochází ke snížení účinnosti terapie tamoxifenem;
- 2) Analyzovat vztah mezi účinností terapie tamoxifenem a polymorfismy *ABCB1*, u kterých se předpokládá změna transportní schopnosti P – glykoproteinu;
- 3) Zjistit, zda zkoumané polymorfizmy ovlivňují vznik a výskyt nežádoucích účinků, které se vyskytují při terapii tamoxifenem.

Hypotézy

- 1) Předpokládáme, že pacientky s variantním fenotypem CYP2D6 PM a IM budou mít při terapii;
- 2) Tamoxifenem vyšší výskyt relapsů nemoci (lokoregionálních / vzdálených) respektive kratší dobu do vzniku relapsu (TTE), ve srovnání s pacientkami s fenotypem UrM a EM;
- 3) Předpokládáme, že ko-medikace inhibitory CYP2D6 bude u pacientek s terapií tamoxifenem;
- 4) Rovněž vést k vyššímu výskytu relapsů respektive kratší době do návratu onemocnění, ve srovnání s pacientkami bez ko-medikace inhibitory CYP2D6.
- 5) Předpokládáme, že pacientky s predikovanou vyšší aktivitou P – glykoproteinu (wt-genotyp) budou mít vyšší výskyt relapsů respektive kratší dobu do vzniku relapsů;
- 6) Předpokládáme, že sledované polymorfismy ovlivňují výskyt a dobu do vzniku nežádoucích účinků tamoxifenu (TTE).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Metody klinické části experimentu

Projekt byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v roce 2008. Všechny pacientky vstupující do projektu byly poučeny o účelu a důvodu projektu a vstoupily do studie na základě své svobodné vůle, vyjádřené podpisem informovaného souhlasu.

Studie byla vedena retrospektivně, se záměrem generovat pilotní data pro plánovanou prospektivní studii. Před zahájením projektu byl předpokládáný nábor patientek stanovený na 180 – 200 patientek. Byla stanovena základní kritéria výběru patientek a určen postup a kompetence v průběhu studie. Klinická část výzkumu probíhala na Onkologické klinice VFN a 1. LF UK v letech 2008 – 2011. Do studie byly zařazeny primárně pacientky s imunohistochemickou pozitivitou estrogenových receptorů v histologii vzorku karcinomu prsu a přednostně s lokalizovaným respektive lokoregionálně pokročilým stádiem onemocnění, které byly v letech 1985 – 2011 léčené na tomto pracovišti. Vyšší stádia onemocnění nebyly primárním vylučovacím kritériem. Dalším vstupním kritériem výběru patientek bylo zahájení hormonální terapie tamoxifenem v průběhu jejich onemocnění.

V případě souhlasu pacientky s účastí ve studii, bylo pacientce odebráno 5 ml nesrážlivé krve do zkumavky s EDTA a krev patientek byla nejpozději do 4 hodin odeslána do laboratoře Ústavu klinické a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (dále ÚKLBD VFN a 1.LF UK v Praze) k dalšímu zpracování.

Byla vytvořena klinická a laboratorní databáze patientek, do které byly v průběhu výzkumu zaznamenávána demografická data o patientkách, klinická data o histologii a rozsahu onemocnění, o průběhu a výsledku terapie tamoxifenem, a dále údaje o nežádoucích účincích a příslušné ko-medikaci s ohledem na vztah k CYP2D6. Laboratorní databáze obsahovala pouze údaje nutné k identifikaci patientek a výsledky příslušných polymorfismů. Průběžně byly ve tříměsíčních intervalech doplňovány výsledky vyšetření polymorfismů u jednotlivých patientek z laboratorní do klinické databáze. V případě zájmu patientek bylo možné pacientky o jejich výsledku

informovat. Postup terapie nebyl výsledkem polymorfismů ovlivněn a bez ohledu na výsledek byly dodrženy platné standardy onkologické terapie.

3.2 Metody laboratorní části experimentu

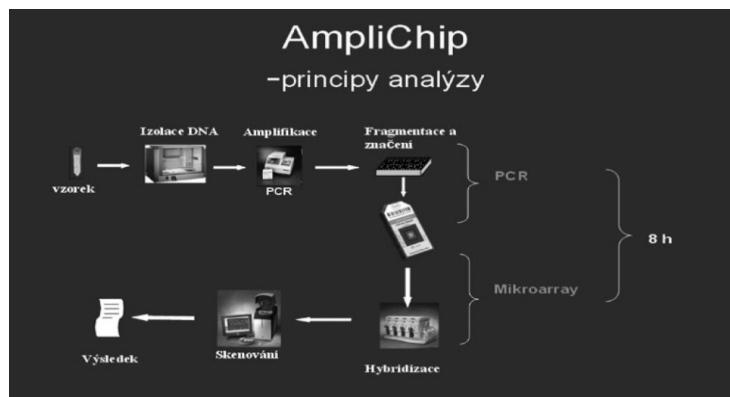
3.2.1 Izolace DNA z periferní krve

Vzorky zmražené periferní žilní krve odebrány a doručeny do ÚKLBD VFN a 1. LF UK v Praze byly zmrazeny a uchovávány při teplotě -20°C do dalšího zpracování. **Izolace DNA** probíhala dle originálního postupu v komerčně dodávaném kitu DNA - QIAmp Blood Mini Kit. Do označených mikrozkušavek bylo postupně nanášeno 20 μl QUIAGEN proteázy, 200 μl krve a 200 μl pufru „AL“. Po důkladném promíchání obsahu mikrozkušavek na vortexu, byly mikrozkušavky inkubovány ve vodní lázni po dobu 10 min při 56°C . Po ukončení inkubace bylo ke směsi přidáno 200 μl 96 % vychlazeného etanolu (precipitace), poté byl celý objem krátce zamíchán na vortexu a následně byl pipetou přenesen do plastové soupravy QIAmp Minicolumn s filtrem a centrifugován po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu, čím bylo zajištěno zachycení DNA v silikagelu kolony. Po přefiltrování celého objemu byl filtr vložen do nové spodní nádoby Collection Tube, filtrát již dále nebyl používán. Následně byla **DNA opakovaně purifikována** následovně: na filtr bylo nanášeno 500 μl pufru „AW1“ a celá soustava byla opětovně centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu. Filtr byl následně vložen do nové mikrozkušavky a filtrát byl znehodnocen. Na filtr bylo nanášeno 500 μl pufru „AW2“ a celý objem byl centrifugován po dobu 6 minut při 14000 otáčkách za minutu. Do nové popsané mikrozkušavky byl vložen filtr, na který bylo nanášeno 200 μl pufru „AE“ a takto upravená směs se nechala odstát při pokojové teplotě ($15 - 20^{\circ}\text{C}$) po dobu 6 minut. Následně byla purifikovaná DNA centrifugována ještě 1 minuty při 8000 otáčkách za minutu. Tentokrát byl znehodnocen filtr. Finální DNA ve filtrátu v mikrozkušavce byla uchovávána v lednici při 4°C .

3.2.2 Metodika stanovení genotypu CYP2D6

Diagnostika polymorfismů CYP450 pomocí mikročipu **AmpliChip CYP450 (Roche USA)** je založena na detekci 25 nejčastějších mutací genu *CYP2D6* (*3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *36, *40,

*41 a duplicita a multiplicita genu) a nejčastější mutací genu *CYP2C19* *2. Princip stanovení je přehledně zobrazen na **Obr.3** je popsán dříve (Zima T. et al., 2006).



Obr. 3: Princip analýzy CYP450 pomocí AmpliChupu (Roche, USA)

Zdroj: (převzato ze :Zima T. et al., 2006)

U vzorků s ne zcela jednoznačným výsledkem metodou AmliChip byl proveden alternativní způsob detekce genotypu *CYP2D6*. Z DNA z periferních leukocytů byla provedena amplifikace cílového úseku DNA pomocí PCR metody (Buzková P. et al, 2008).

Reakce probíhala v následujícím cyklu: iniciální denaturace (94°C, 2 min), 35 cyklů denaturace (94°C, 20 s). Jednotlivé reakce v PCR termocycleru probíhaly za použití primerů (**Tab 3**) za předdefinovaných podmínek (57°C, 70 s) a při předdefinovaném dokončení (68°C, 7 min). Reakce probíhala v reakční směsi obsahující 100 ng genomické DNA, 0,24 mM primerů (P100/P200 – **Tab. 3**), 1 LA PCR buffer (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká Republika) a 1,5 jednotek LA polymerázy MIX (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká Republika). Další PCR reakce probíhala v následujících krocích: iniciální denaturace (94°C, 2 min), 25 cyklů denaturace (94°C, 30 s), annealing (60°C, 40 s) a dokončení (72°C, 7 min). Výsledná reakční směs obsahovala 1 µl zředěného LA-PCR produktu z předchozí společné reakce, PCR pufr (Fermentas, Litva), 1,2 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 200 mM dNTPs (Fermentas, Litva), primery (P51/D2 pro CYP2D6*3 a P-3/P2 pro CYP2D6*4 a *6) a 0,75 jednotek Tag polymerázy (Fermentas, Litva). Získané PCR produkty byly inkubovány 12 hod s BSA AI (New England Biolabs USA) pro CYP2D6 * Bst 3 nebo NI (New England Biolabs USA) pro CYP2D6 *4, *6 při teplotě 37°C nebo 60 °C.

Tab. 3: Použité primery při PCR při stanovení CYP2D6

Označení primeru	Nukleotidová sekvence
P100	5'-GGC CTA CCC TGG GTA AGG GCC TGG AGG AGG A-3'
P200	5'-CTC AGC CTG AAC GTA CCC CTG TCT CAA ATC CG-3'
P*3	5'- CCT GGG CAA GAA GTC GCT GGA CCA G – 3'
P2	5'- GAG ACT CCT CGG TCT CTC G – 3'
P51	5'- GCT GGG GCC TGA GAC TT – 3'
D2	5'- GGC TGG GTC CCA GGT CAT AC – 3'
Cyp17	5'- TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT – 3'
Cyp32	5'- CAC GTG CAG GGC ACC TAG AT – 3'
P13	5'- ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA – 3'
P24	5'- GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C – 3'
P81	5'- CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC – 3'

Zdroj: vlastní zpracování

Fáze detekce probíhala **skenováním silikagelové ploténky AmpliChipu**, na které jsou kovalentními vazbami navázané sondy tzv. „genové reportéry“, které obsahují úseky oligonukleotidů komplementární k sledované oblasti ssDNA společně s navázanými fluorofory. Nanesením směsi amplifikované DNA na destičku mikročipu dochází ke vzniku kovalentní vazby komplementárních úseků ssDNA a sondy. Po omytí a odstranění úseků vázaných vodíkovými vazbami a následném skenování laserem dochází k excitaci fluoroforu a vyzáření světla o určité intenzitě, kterou lze po zesílení v zesilovači měřit a vyhodnocovat.

Při alternativní metodě genotypizace byly výsledné fragmenty jsou rozděleny na 3% agarózovém gelu (Top vision, Fermentas, Litva), který byl v dalším kroku obarven ethidiumbromidem a nakonec detekován pod UV lampou. Přítomnost genu duplikace a CYP2D6*5 byla identifikována za použití primerů Cyp17/Cyp32, resp. P13/P24/P81. Podmínky genotypizace byly stejné jako u výše uvedeného postupu, jen fragmentace probíhala na 1% agarózovém gelu.

Hodnocení polymorfismů *CYP2D6*:

Za wild-type (funkční alely, wt) je považována alela **1*.

Všechny ostatní detekované alely jsou považovány za variantní alely (deficitní, vt) a predikují přítomnost minimálně IM nebo PM:

- a) **Ultrarychlý metabolizér (UrM)** – predikujeme v přítomnosti více než 2 funkčních alel **1*;
- b) **Rychlý metabolizér (EM)** – v případě 2 funkčních alel **1* / **1*;
- c) **Střední metabolizér / heterozygot (IM)** – v přítomnosti 1 funkční alely (**1*) a 1 variantní alely;
- d) **Pomalý metabolizér (PM)** – v přítomnosti dvou a více variantních alel (jiných než **1*).

3.2.3 Metodika stanovení genotypu *ABCB1* genu pro P-gp

3.2.3.1 Genotypizace *rs1045642*

Genotypizace polymorfismu *rs1045642* byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce a následné restrikce PCR produktů restrikčními endonukleázami (PCR-RFLP analýzy) podle popsané metodiky (*Pechandová H. et al., 2006*). PCR reakce probíhala v termocycleru v těchto krocích: iniciální denaturace (94 °C, 2 minuty), 35 cyklů denaturace (94 °C, 20 sekund), annealing (60 °C, 120 sekund) a dokončení (72 °C, 7 minut). Reakční směs obsahovala 2 µl DNA, PCR pufr (Fermentas, Litva), 1,2 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 200 mM dNTPs (Fermentas Litva), primery MDR-11 a MDR-12 (nukleotidová sekvence je uvedena v **Tab.4**) a 0.75 jednotek Tag polymerázy (Fermentas, Litva). PCR produkt byl inkubován 12 hodin s Bsp 1431 (New England Biolabs, USA) při teplotě 37 °C. Naštěpené fragmenty byly rozděleny na 3,5% agarózovém gelu (Top vision, Fermentas, Litva), který byl následně obarven ethidiumbromidem a detekován pod UV lampou.

Tab. 4: Oligonukleotidové primery pro analýzu *rs1045642*

Označení primeru	Nukleotidová sekvence
MDR – 11	5'-TGTTTCAGCTGCTTGATGG-3'
MDR – 12	5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'

Zdroj: vlastní zpracování

3.2.3.2 Genotypizace *rs2032582*

Genotypizace polymorfismu *rs2032582* byla rovněž provedena pomocí PCR-RFLP analýzy a to obdobným způsobem jako genotypizace polymorfismu *rs1045642*. Jediným rozdílem byla pouze doba nasedání primerů (1 minuta při 60°C pro *G2677T* a 45 sekund při 60°C pro *G2677A*). Nukleotidová sekvence primerů je popsána v **Tab. 5**.

Tab. 5: Oligonukleotidové primery pro analýzu *G2477T/A*

Označení primeru	Nukleotidová sekvence
MDR – 9	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3'
MDR – 10	5'-GTTTGACTCACCTTCCCAG-3'
MDR – 11	5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCC-3'

Zdroj: vlastní zpracování

3.3 Statistické metody

Statistickou analýzou byly hodnoceny všechny, klinicky i laboratorně, získané údaje pro oba podsoubory (premenopauzální a postmenopauzální pacientky) a pro celkový soubor patientek. Distribuce zkoumaných polymorfismů byly srovnány s očekávanými frekvencemi v dané populaci v souladu s Hardy- Weinbergovou rovnováhou. Pomocí D'Agostino-Personova testu byla v úvodu statistického hodnocení ověřena normalita každého souboru a z výsledků následně vyplynulo užití parametrických resp. neparametrických testů pro zkoumaný soubor.

Primárním cílem bylo stanovení času do události (Time to Event – TTE), který byl kalkulován od dne diagnózy po den prokázání návratu nemoci (lokální recidivy, generalizace anebo progresu) zobrazovací metodou. Data patientek bez návratu nemoci byly cenzorovány dnem poslední kontrolní vizity v sledovaném období s trvající celkovou remisí nemoci.

Ke zhodnocení základních demografických dat byly využity metody základní deskriptivní statistiky. Věk, rozložení ER, PR byly kalkulovány jako spojité hodnoty a jejich vzájemné závislosti byly hodnoceny pomocí regresních analýz a grafické zobrazení pomocí bodových grafů. Pro nespojité hodnoty bylo voleno grafické vyjádření pomocí krabicových grafů. Pro srovnání skupin (progredující a neprogredující) a tedy závislost kategorických dat byla posouzena pomocí 2x2 kontingenčních tabulek a pro testování významnosti byl použit Pearsonův χ^2 (chí-kvadrát) test.

Statistická signifikance byla testována neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem ANOVY. Primární analýza rizika události (TTE) byla provedena Kaplan-Meierovou analýzou a následné multivariátní testování prognostické síly sledovaných parametrů bylo provedeno obvyklou Cox proporcionální analýzou. Ve všech testech byla za hranici statistické signifikance považována hodnota 5% signifikance.

4 VÝSLEDKY

4.1 Demografie a základní popisná statistika souboru

4.1.1 Demografie celého souboru

V experimentální části výzkumu byly vytipovány pacientky, kterým byla po jejich písemném souhlasu odebrána krev ke genetickým analýzám. Do studie bylo zařazeno 258 patientek (187 postmenopauzálních a 71 premenopauzálních). **Postmenopauzální pacientky** byly zařazeny do sledovaného souboru na základě obecné definice postmenopauzálního stavu – tj. odstup od poslední menstruace min 1 rok, nebo na základě hormonálního profilu odpovídajícího postmenopauzálním respektive perimenopauzálním hodnotám hodnot sexuálních hormonů. **Premenopauzální status** patientek byl definován přetrvávající menstruací v době diagnózy, respektive potvrzením premenopauzálních hodnot hormonálního profilu patientek. Přehledně jsou základní demografické parametry obou podsouborů uvedeny v následující tabulce (**Tab. 6**).

Tab. 6: Demografie, histologický a klinický stav a terapie v celém souboru

Charakteristika	PREMENOPAUZÁLNÍ N=71	POSTMENOPAUZÁLNÍ N=187
Věk v době Dg median (rozmezí) [roky]	44 (26-52)	57 (43-80)
Průměrná délka sledování (rozmezí) [měsíce]	56 (8-198)	91 (6-244)
Délka užívání TMX median “ (rozmezí) [měsíce]	43 (8-84)	60 (6-121)
Stadium	No (%)	No (%)
T1 (≤2cm)	43 (60.6 %)	115 (61.5 %)
T2	19 (26.8 %)	39 (20.8 %)
T3	3 (4.2 %)	6 (3.2 %)

T4	1 (1.4 %)	16 (8.6 %)
Tx	2 (2.8 %)	2 (1 %)
Tis	3 (4.2 %)	9 (4.9 %)
N stav spádových uzlin	No (%)	No (%)
N0-mic	45 (63.4 %)	133 (71.1 %)
N1	21 (29.6 %)	39 (29.6 %)
N2-3	2 (2.8 %)	6 (3.3 %)
Nx	3 (4.2 %)	9 (5.0 %)
Histologie	No (%)	No (%)
IDC	52 (73.2 %)	139 (74.3 %)
ILC	10 (14.1 %)	28 (15.0 %)
Duktolobulární smíšený (ILC+IDC)	4 (5.6 %)	13 (6.9 %)
Jiný typ histologie	5 (7.4 %)	7 (3.8 %)
Grading	No (%)	No (%)
G1	15 (21.1 %)	23 (12.3 %)
G2	24 (33.8 %)	67 (35.8 %)
G3	11 (15.5 %)	35 (18.8 %)
Gx	21 (29.6 %)	62 (33.1 %)
PR stav	No (%)	No (%)
PR pozitivní (> 10%)	62 (87.3 %)	126 (67.4 %)
PR negativní resp do 10%	7 (9.9 %)	40 (21.4 %)
PR není známo	2 (2.8 %)	21 (11.2 %)

Her-stav	No (%)	No (%)
Negativní	46 (64.8 %)	107 (57.2 %)
c-erbB-2 / FISH pozitivní	6 (8.5 %)	31 (16.6 %)
Není známo- vyšetřeno	19 (26.7 %)	49 (26.2 %)
Chemoterapie	No (%)	No (%)
Adjuvantní- pooperační	27 (38.0 %)	52 (27.8 %)
Neoadjuvantní- předoperační	9 (12.7 %)	18 (9.6 %)
Kombinace – adjuvantní a neoadjuvantní	4 (5.6 %)	4 (2.1 %)
Bez chemoterapie	31 (43.7 %)	113 (60.5 %)
Radioterapie-adjuvantní	No (%)	No (%)
Ano	48 (67.6 %)	92 (49.2 %)
Ne	20 (28.2 %)	95 (50.8 %)
Není známo	3 (4.2 %)	0
Chirurgická terapie	No (%)	No (%)
Mastectomie / ablace prsu	29 (40.8 %)	109 (58.3 %)
Segmentectomie/Tumorectomie/Lumpectomie	42 (59.2 %)	78 (41.7 %)

Zdroj: vlastní zpracování

Průměrný věk pacientek byl očekávaně nižší ve skupině premenopauzálních pacientek s mediánem 44 let (rozmezí 26 – 52 let), ve srovnání s postmenopauzálními pacientkami, kde byl průměrný věk pacientek 58,4 let s mediánem věku 57 let a rozmezím 43 – 80 let. Průměrná délka sledování byla ve skupině premenopauzálních rovněž nižší 56 (8 – 198) měsíců, zatímco u postmenopauzálních pacientek 91 (6 – 244) měsíců. Medián délky užívání tamoxifenu v průběhu sledování byl opět u premenopauzálních pacientek nižší 43 (8 – 84) měsíců, ve srovnání s pacientkami postmenopauzálními, kde byla dosažená doporučená délka terapie TMX u většiny pacientek a medián délky

TMX terapie byl 60 měsíců (6 – 121) měsíců. Toto bylo v první řadě způsobeno relativně vyšším podílem recentně diagnostikovaných premenopauzálních pacientek s kratší dobou sledování.

Stádia onemocnění byly v obou podsouborech zastoupeny relativně obdobně. Většina pacientek (60%) měla iniciační stadium nemoci T1. Zastoupení T2 a vyšších stádií bylo v obou podsouborech srovnatelné s lehce vyšším zastoupením T2 u premenopauzálních a T4 u postmenopauzálních pacientek. Neinvazivní karcinom *in situ* (Tis) byl rovněž mezi podsoubory zastoupen rovnoměrně (4.2 % v premenopauzálním a 4.9 % v postmenopauzálním souboru). Rozvrstvení onemocnění s uzlinovým postižením bylo v obou podsouborech opět srovnatelné (N1 – 30 % a N2 - 3 %, Nx s nejasným postižením uzlin 4 -5 %). Výběr pacientek splňoval vstupní kritéria pacientek s většinou pacientek v lokalizovaném respektive mírně lokálně pokročilém stadiu nemoci a relativně rovnoměrným rozvrstvením stádií v obou podsouborech.

Histologický rozbor obsahoval: histologický typ tumoru, stupeň diferenciacie tumoru (tvz. „Grading“ – G), pozitivitu estrogenových (ER) a progesteronových receptorů (PR) a status HER2/neu. S ohledem na velkou variabilitu histologických typů a podtypů maligních nádorů prsu a různé histologické klasifikace, které vznikaly v průběhu času, uvádíme pro přehlednost původní rozdělení na invazivní duktální karcinom (IDC, dnes s označením NST) se zahrnutím jeho *in situ* varianty (DCIS) s výskytem u 52 (73.2 %) premenopauzálních pacientek a 139 (74,3 %) postmenopauzálních pacientek. Dalším histologickým podtypem byl lobulární karcinom (ILC) s/bez *in situ* variantou LCIS, opět rovnoměrně zastoupen – 10 (14.1 %) premenopauzálních pacientek u 28 (15 %) postmenopauzálních pacientek. Smíšený duktálnělobulární karcinom byl stanoven u 4 (5.6 %) premenopauzálních pacientek a 13 (6.9 %) postmenopauzálních pacientek. Skupina „jiný typ histologie“ zahrnovala ostatní histologické podtypy (mucinózní, nediferencovaný, anaplastický karcinom z prstenčitých buněk, neuroendokrinní a jiné). Tyto jiné histologické typy nádorů prsu byly zachyceny lehce více v podsouboru premenopauzálních pacientek (7 %) než u postmenopauzálních pacientek (4 %). Významným prognostickým parametrem je stupeň dediferenciacie tumoru (G), při hodnocení naší práce byl použit systém hodnocení 3 stupňů diferenciacie (G1 – dobře diferencovaný tumor, G2 – středně diferencovaný tumor, G3 – nízce diferencovaný a dediferencovaný tumor). Z histologických výsledků při sběru klinických data bylo

zřejmé, že v obou podsouborech bylo kolem 30 % pacientek s nestanoveným stupněm diferenciace (Gx). Toto relativně vysoké číslo je způsobeno tím, že histologie starší 15 let neobsahovaly rutinně stanovení stupně diferenciace, a toto vyšetření rovněž nebylo standardem u histologického hodnocení ILC. Při hodnocení obou podsouborů bylo zřejmé vyšší relativní zastoupení lepších stupňů diferenciace u premenopauzálních pacientek. Dobře diferencované formy tumorů (G1) se vyskytovaly více v podsouboru premenopauzálních pacientek – 21 % (15 pacientek), zatímco v podsouboru postmenopauzálních pacientek je G1 zastoupen pouze v 12 % případů (23 pacientek). Výskyt středně diferencovaných forem G2 byl srovnatelně zastoupen mezi oběma podsoubory – v 33.8 % (24) premenopauzálních pacientek, respektive 35.8 % (67) postmenopauzálních pacientek. Nízce diferencované a dediferencované výsledky histologie byly naopak lehce čtenější u postmenopauzálních pacientek – 18.8 % (35 pacientek), zatím co u premenopauzálních pacientek byl jejich výskyt nižší – 15.5 % (11 pacientek). Expresí progesteronových receptorů (PR) je dalším známým prognostickým faktorem. Pozitivita PR, vyjádřená expresí PR více než 10 %, byla čtenější u premenopauzálních pacientek – 87.3 % (62 pacientek). V postmenopauzálním souboru byla PR pozitivita pozorovaná pouze u 67.4 % (126 pacientek). Úměrně tomu bylo v postmenopauzálním souboru pozorováno více PR-negativních pacientek (s expresí PR méně než 10%) než v souboru premenopauzálním – 21.4 % versus 9.9 %. Nejasná exprese PR (PRx) byla rovněž relativně vyšší v podsouboru postmenopauzálních pacientek – 11.2 % versus 2.8 % v premenopauzálním souboru. Tuto skutečnost opět přisuzujeme stáří některých histologických popisů vzorků v souboru postmenopauzálních pacientek, kdy hodnocení PR nebylo do roku 1995 standardem. Imunohistologické vyšetření exprese c-erbB-2 patří posledních deset let k rutinním histologickým stanovením u karcinomu prsu, a je důležitým prognostickým parametrem a prediktivním parametrem rezpozibility onemocnění na trastuzumab (Herceptin) a další léky ze skupiny EGFR/Her inhibitorů (např. standardně v péči využíván lapatinib). V případě nejednoznačného výsledku, nebo positivity c-erbB-2 2+ se stanovuje amplifikace Her2/neu pomocí metody FISH. Je nutné zdůraznit, že v případě, kdy nebyl u pacientek zaznamenán relaps onemocnění, nebyl tento chybějící údaj rutinně doplňován pouze pro účely našeho výzkumu, a proto chybí ve značném procentu pacientek (v obou podsouborech cca u 26 % pacientek). Literárně udávaná hodnota relativního výskytu Her2/neu positivity je 20 %, čemu přibližně odpovídá 16.6 % (31 pacientek) výskyt u testovaných postmenopauzálních pacientek. Nižší výskyt c-erbB-2 resp. Her2/neu positivity u premenopauzálních pacientek (8.2 % –

6 pacientek) přikládáme biasu při relativně nízkém celkovém počtu pacientek v premenopauzálním podsouboru. S ohledem na význam zastoupení estrogenních receptorů (ER) na efektivitu terapie tamoxifenem a tudíž i jeho význam na výběr pacientek pro sledování a dopad celé předložené práce, uvádím rozvrstvení zastoupení ER v jednotlivých podsouborech samostatně v přehledné tabulce – Tab. 7.

Tab. 7: Expres ER v podsouborech premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek

ER %	0-10	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90-94	95-100
Premenopauzální (%)	5 7 %	2 3%	0 -	1 1%	4 5%	9 12%	5 7%	10 13%	2 3%	10 13%	3 3%	13 17%	12 16%
Postmenopauzální (%)	7 4%	4 2%	5 3%	4 2%	6 3%	10 5%	6 3%	9 5%	5 3%	20 11%	9 5%	60 32%	42 22%

Zdroj: vlastní zpracování

Z tabulky je zřejmé rovnoměrnější rozvrstvení exprese ER v podsouboru premenopauzálních pacientek s jasnou převahou ER nad 50 %, kde jsou ale ER o vyšší expresi dále zastoupeny relativně rovnoměrně 12 – 17 %. V kontrastu s poměrně rovnoměrným zastoupením kategorií s vyšší expresí ER u premenopauzálního podsouboru, je výrazné procento exprese ER v postmenopauzálním podsouboru soustředěno do exprese 90 % a více (54 % ve srovnání s 33 % v souboru premenopauzálních pacientek). Toto rozvrstvení ER v obou podsouborech kopíruje obecně známý fakt vyšší exprese ER u postmenopauzálních pacientek.

Při rozboru **terapeutických metod** lze na úvod krátce konstatovat, že v souboru premenopauzálních pacientek byla častěji aplikována **chemoterapie** (předoperační, pooperační nebo jejich kombinace) v 56.3 % (40 pacientek), zatímco u postmenopauzálních pacientek pouze ve 39.5 % (74 pacientek). Tento fakt nás nepřekvapil, protože pro volbu terapie u karcinomu prsu vnikají v průběhu let různé skórovací systémy, ve kterých je jedním z důležitých parametrů věk pacientky. U starších pacientek s vysokou expresí ER a příznivou charakteristikou tumoru (dobře diferencovaný karcinom, nízký proliferací index Ki67 a pod) je i u pokročilejších stádií (T1c a výše) upřednostňována hormonální terapie. Dalším zdůvodněním je skutečnost, že terapie je přizpůsobena celkovému stavu pacientky a přidruženým onemocněním, a lze tedy předpokládat, že mladší premenopausální pacientka v dobrém celkovém stavu s menším

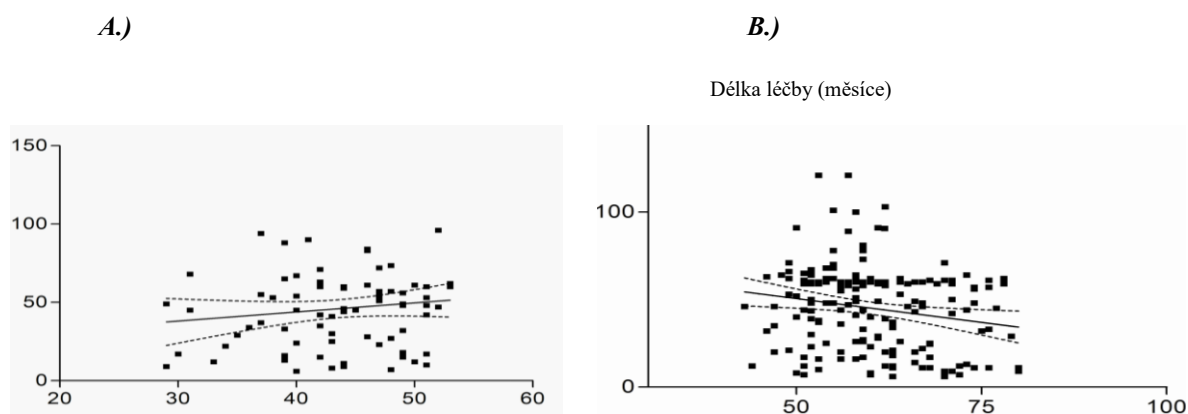
množstvím komorbidit snese chemoterapii mnohem lépe, než starší pacientka s dalšími přidruženými nemocemi. Postupem času se standardy **chirurgické terapie** karcinomu prsu vyvíjeli směrem k parciálním resekčním (segmentectomii, lumpectomii, tumorectomii). Při srovnání našich podsouborů jsou parciální resekce více zastoupeny u postmenopauzálních než u premenopauzálních patientek (58.3 % respektive 40.8 %), což paradoxně nepotvrdilo náš předpoklad vyšší snahy o prs zachovný výkon u mladších premenopauzálních patientek. Volba výkonu závisí mimo jiné i na uspokojivém kosmetickém efektu (tj. uložení tumoru, jeho velikosti a poměru velikost tumoru k velikosti prsu) a přání pacientky. Nakolik byly stádia nemoci v obou podsouborech relativně rovnoměrně rozvrstveny, pouze s mírně vyšším výskytem T2 a T3 stádií u premenopauzálních patientek, přikládáme paradoxně nižší výskyt parciálních resekcí u premenopauzálních patientek spíše opět na vrub biasu při nižším počtu patientek v tomto podsouboru. **Pooperační (adjuvantní) radioterapie** je obecně indikovaná u všech patientek po parciální resekci prsní žlázy a dále u patientek s pokročilejším onemocněním ($\geq T3$) resp pozitivitou uzlin po kompletní mastektomii resp. ablaci prsu. Radioterapie byla aplikovaná po operaci u 48 premenopauzálních patientek (67.6 %), z čeho bylo cca 60 % patientek po některé formě prs zachovného chirurgického výkonu, a u 92 postmenopauzálních patientek (49.2 %), z čeho bylo 78 patientek (41.7 %) patientek po některé formě parciální operace prsu a další pacientky měly adjuvantní radioterapii indikovanou s ohledem na stádium nemoci.

Dalším důležitým klinickým údajem je zastoupení patientek se „**selháním terapie tamoxifenem**“, tj. recidivy nebo generalizace onemocnění při nebo po terapii tamoxifenem, a doba do události (TTE). V **premenopauzálním souboru** bylo pro účely studie **hodnoceno 71 patientek**. Ve sledovaném období mělo návrat onemocnění **11 patientek (15.5 %)** s **průměrným TTE 56.5 měsíce**. V **postmenopauzálním souboru** došlo k selhání terapie tamoxifenem u **53 hormonálně pozitivních patientek (31 %)** s **průměrným TTE 65.9 měsíců**.

4.1.2. Základní popisná statistika demografických a klinických parametrů

4.1.1.1 Věk v době diagnózy, délka užívání tamoxifenu, délka sledování

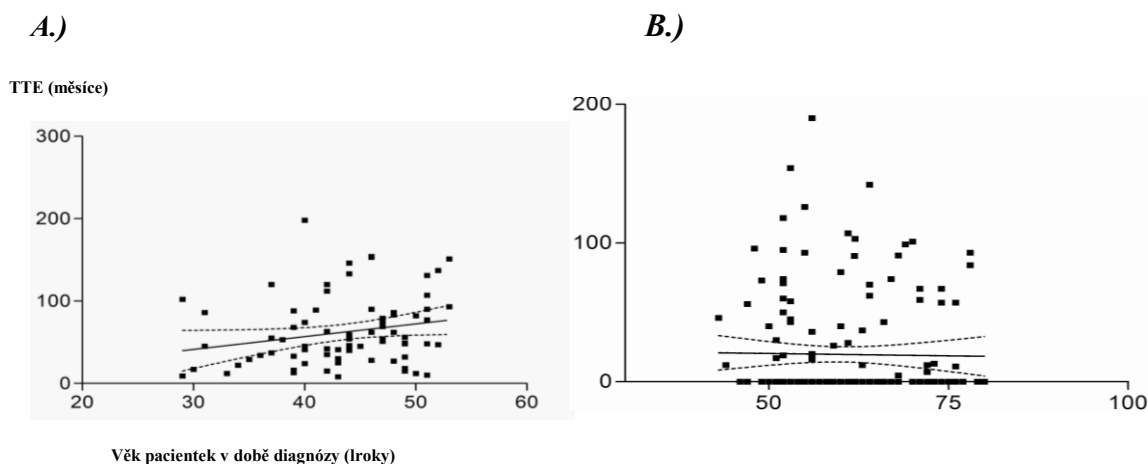
Bodové grafy vztahu věku patientek v době diagnózy k délce užívání tamoxifenu v obou podsouborech jsou znázorněny na **Obr. 4 A a B**. V premenopauzálním podsouboru lze na základě velkého rozptylu bodů odhadnout nízkou lineární závislost obou zkoumaných znaků. V podsouboru postmenopauzálních patientek je rozložení bodů soustředěno kolem obvyklého pětiletého (60 – měsíčního) užívání tamoxifenu bez zřejmé závislosti na věku patientek.



Obr. 4: Bodový graf regresní analýzy vztahu délky užívání tamoxifenu a věku patientek v době diagnózy: A.) v podsouboru premenopauzálních a B.) v podsouboru postmenopauzálních patientek

Zdroj: vlastní zpracování

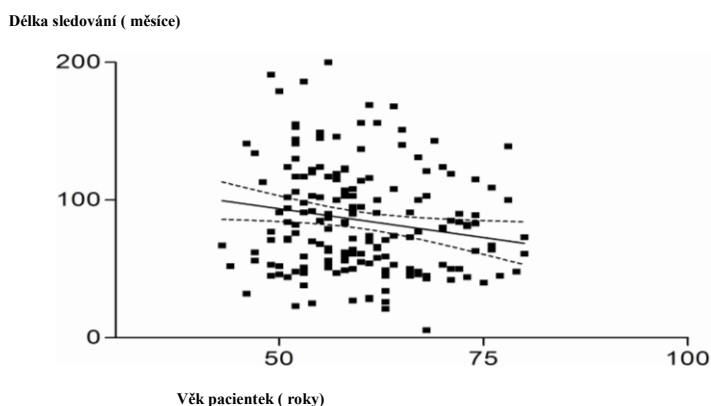
Následně jsme provedli regresní analýzu **závislosti TTE na věku patientek v době diagnózy** pro oba podsoubory (**Obr. 5**). S ohledem na výrazný rozptyl hodnot kolem regresní křivky v postmenopauzálním podsouboru (**B.**) lze předpokládat nezávislost délky TTE na věku patientek. V premenopauzálním souboru (**A.**) relativně rovnoměrná koncentrace bodů kolem regresní křivky nasvědčoval možné lineární závislosti TTE od věku patientek v době diagnózy, ale následná regresní analýza nepotvrdila významnost signifikance tohoto vlivu ($p = 0.514$, 95 % CI = $-0.01363 - 3.124$).



Obr. 5: Bodový graf regresní analýzy závislosti TTE na věku pacientek v době diagnózy

Zdroj: vlastní zpracování

Závislost **délky sledování** a **věku pacientek** znázorňuje v souboru všech progredujících pacientek **Obr. 6**. S ohledem na relativně rovnoměrné rozdělení bodů kolem regresní přímky v grafu byla následně provedena regresní analýza potvrzující statisticky významnou lineární závislost délky sledování od věku pacientky v době diagnózy ($p = 0.0234$, 95% CI – 1.555 – 0.1179).



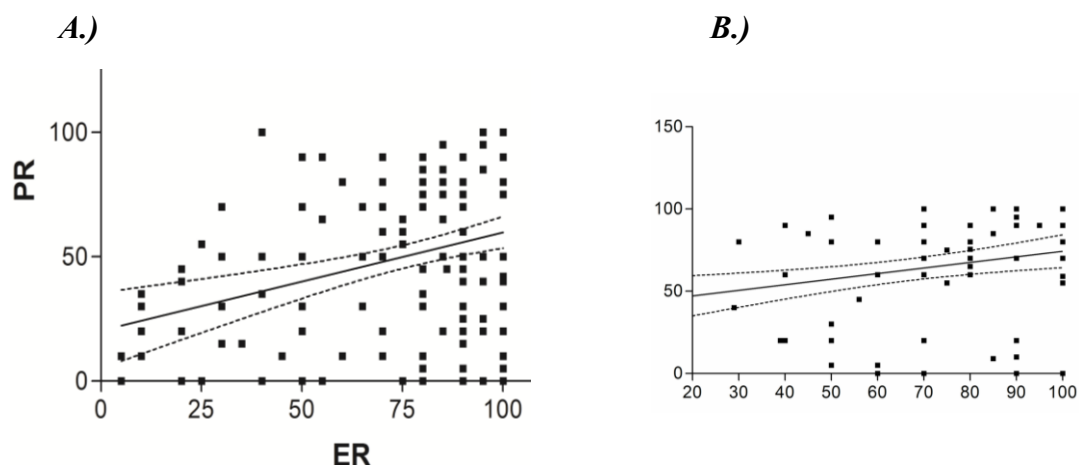
Obr. 6: Bodový graf regresní analýzy délky sledování od věku progredujících pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

4.1.1.2 Hormonální receptory

Regresní analýzou byla v obou podsouborech prokázána vzájemná lineární závislost míry exprese ER a PR **Obr. 7 A, B**. Graficky nasvědčoval rozptyl bodů kolem regresní křivky spíše pro nezávislost míry exprese těchto dvou parametrů, ale provedena regresní analýza prokázala vzájemnou lineární závislost míry exprese hormonálních receptorů v obou podsouborech – v premenopauzálním podsouboru ($p = 0.0033$, 95%CI =

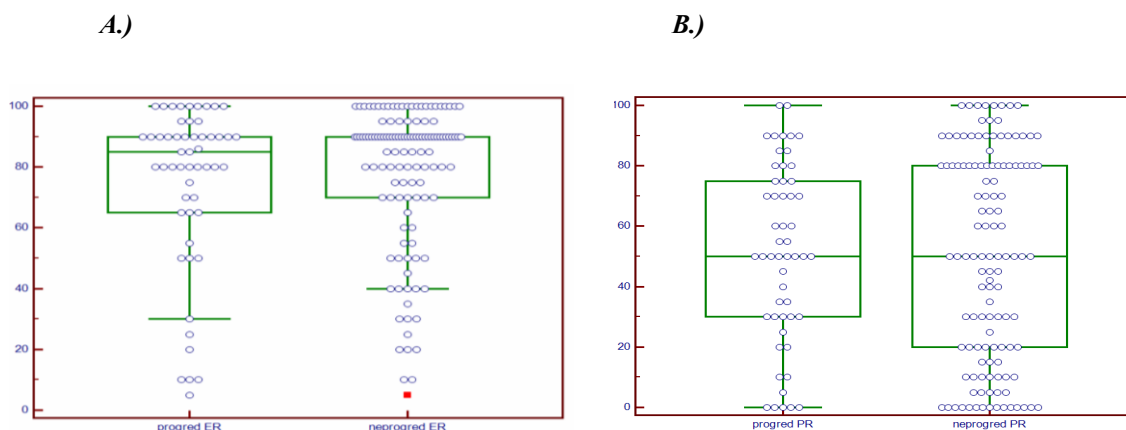
0.1160 – 0.5604) a v postmenopauzálním souboru ($p < 0.0001$, 95% CI: 0.2061 – 0.5824). Toto si vysvětlujeme shodnými regulačními mechanismy, které řídí produkci hormonů a liberinů a mají vliv na produkci hormonálních receptorů.



Obr. 7: Bodový graf závislosti míry exprese PR a ER v A.) premenopauzálním podsouboru a B.) postmenopauzálním podsouboru

Zdroj: vlastní zpracování

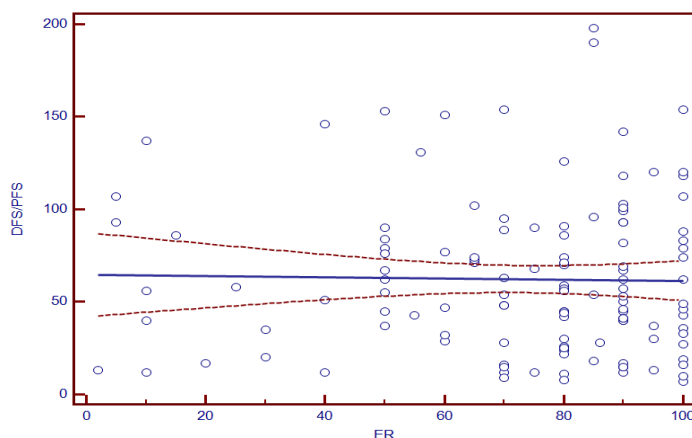
Následně jsme provedli srovnání míry exprese ER a PR ve skupině progredujících a neprogredujících pacientek v celém souboru, graficky znázorněno krabicovými grafy na **Obr. 8 A, B**. Je nutno podotknout, že oba grafy vznikli z hodnotitelného souboru ER respondentních pacientek. Z grafické extrapolace vyplývá statisticky srovnatelné zastoupení výskytu obou hormonálních receptorů v obou skupinách a nelze tedy říct, že ve skupině progredujících pacientek by byla míra exprese ER a PR odlišná než ve skupině neprogredujících pacientek.



Obr. 8: Krabicové graf srovnání míry exprese hormonálních receptorů mezi skupinami progredujících a neprogredujících pacientek: A.) pro ER, B.) pro PR

Zdroj: vlastní zpracování

V celém zkoumaném souboru byla provedena analýza závislosti TTE na míře exprese ER. Rozptýl bodů kolem regresních křivek jasně naznačuje nelineární závislost ve všech zkoumaných parametrech v celém souboru souboru (**Obr.9**).

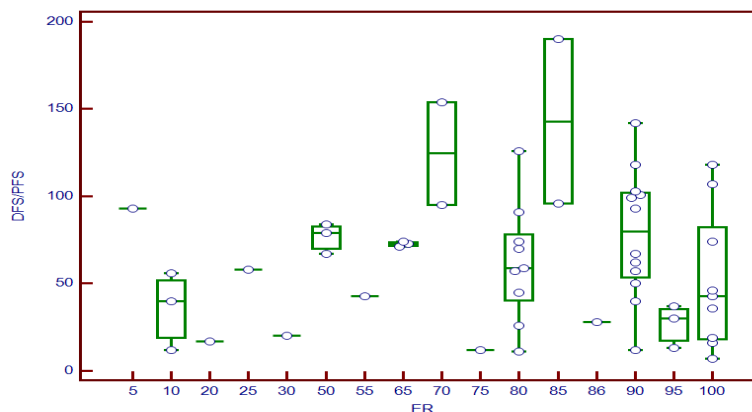


Obr. 9: Bodový graf regresní analýzy závislosti TTE na míře exprese ER

Zdroj: vlastní zpracování

Analýza závislosti délky TTE od míry exprese ER v souboru progredujících pacientek, s cílem vysledovat případnou závislost – znázorněno krabicovým grafem na **Obr. 10**. Z grafu jsou zřejmé významné výkyvy mediánu TTE v 85, 95 a 100 percentilu, které nasvědčují významné závislosti TTE od míry exprese ER. Následná statistická analýza ANNOVA potvrdila signifikantní závislost TTE progredujících pacientek od míry exprese ER ($p = 0.023$, $F - \text{ratio } 2.241$), což potvrzuje platnost faktu, že míra exprese ER

je u karcinomu prsu prognostickým faktorem i prediktivním faktorem pro efekt hormonální terapie.

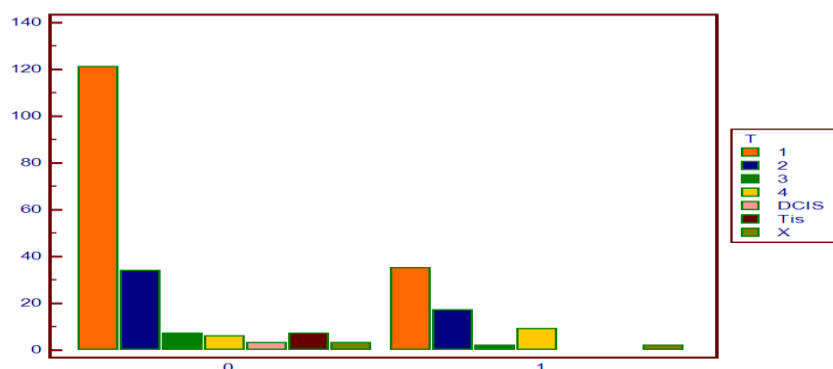


Obr. 10: Krabicový graf vztahu TTE a procentuální exprese ER u progredujících pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

4.1.1.3 Stadium nemoci

Stadium nemoci je dalším, obecně známým, nezávislým prognostickým faktorem s prokázaným vlivem na riziko návratu nemoci a délku TTE. Pro objasnění míry vlivu stadia nemoci (T) na prognózu jsme provedli srovnání výskytu jednotlivých stadií ve skupině progredujících a neprogredujících pacientek v celém zkoumaném souboru – vyjádřeno sloupcovým grafem **Obr. 11**. Z grafu je zřejmý nižší výskyt progredujících pacientek ve stadiu T1, s vyšším relativním výskytem progresí ve stadiu T2. Stadium T3 je pro malé zastoupení pacientek tohoto stadia nehodnotitelné a nejmarkantněji je tento vztah vyjádřen ve stadiu T4, kde počet „progresí nebo recidiv“ přesahuje počet neprogredujících pacientek. Následným statistickým hodnocením pomocí Coxových analýz, blíže popsanych v dalších kapitolách, byl v postmenopauzálním souboru potvrzený předpokládaný signifikantní vztah mezi stadiem a průběhem nemoci tj. TTE ($p = 0.0313$, $\chi^2 = 13,854$). Obdobná analýza v premenopauzálním podsouboru neprokázala statisticky významný vliv ($p = 0.9866$, $\chi^2 = 0.346$).



Obr. 11: Sloupkový graf zastoupení jednotlivých stadií mezi skupinami neprogredujících (0) a progredujících (1) pacientek v celém souboru

Zdroj: vlastní zpracování

4.2 Analýzy sledovaných polymorfismů *CYP2D6*, *ABCB1* a ko-medikace

4.2.1 Ko-medikace induktory a inhibitory *CYP2D6*

Dle našeho předpokladu vede ko-medikace inhibitory *CYP2D6* k předpokládanému snížení efektivity tamoxifenu na podkladě alterace přeměny tamoxifenu na jeho výrazně účinnější metabolity (4-OH-tamoxifen a endoxifen), zatím co induktory/substráty *CYP2D6* povedou opět ke snížení efektivity terapie tímto preparátem, a to blokádou funkčních míst enzymu. Přehled zastoupení ko-medikace inhibitory a induktory *CYP2D6* v obou podsouborech a jejich zastoupení pro podskupiny progredujících pacientek je znázorněn v *Tab. 8*.

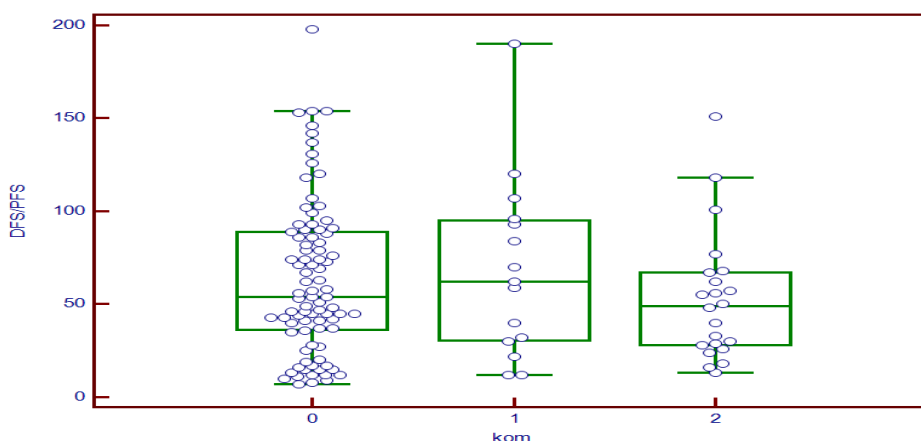
Tab. 8: Přehled ko-medikace inhibitory a induktory *CYP2D6* v obou podsouborech

	Inhibitory počet (%)	Induktory počet (%)
Premenopauzální	12 (17%)	5 (7%)
- progredující	3 (27,3%)	1 (9%)
Postmenopauzální	27 (15,3%)	25 (14,6%)
- progredující	9 (17%)	10 (18,9%)

Zdroj: vlastní zpracování

V podsouboru premenopauzálních pacientek bylo zaznamenáno 12 pacientek (17 %) s ko-medikací inhibitory CYP2D6 a 5 pacientek (7 %) s induktory CYP2D6. Z 11 progredujících premenopauzálních pacientek měly 3 pacientky (27 %) v průběhu terapie tamoxifenem ko-medikaci inhibitory CYP2D6 a pouze 1 pacientka (9 %) induktory/substráty. Z těchto výsledků je zřejmé relativně vyšší zastoupení pacientek s ko-medikací mezi progredujícími pacientkami. V podsouboru 187 postmenopauzálních pacientek mělo inhibitory CYP2D6 27 (15 %) pacientek a induktory CYP2D6 25 (13 %) pacientek. Ve skupině tzv. „progredujících“ pacientek byla ko-medikace inhibitory CYP2D6 zachycena v průběhu terapie tamoxifenem u 9 (17 %) pacientek a induktory u 10 (20 %) pacientek. V tomto poměrně větším souboru již není vyšší zastoupení ko-medikace inhibitory a induktory CYP2D6 mezi progredujícími pacientkami vyjádřeno.

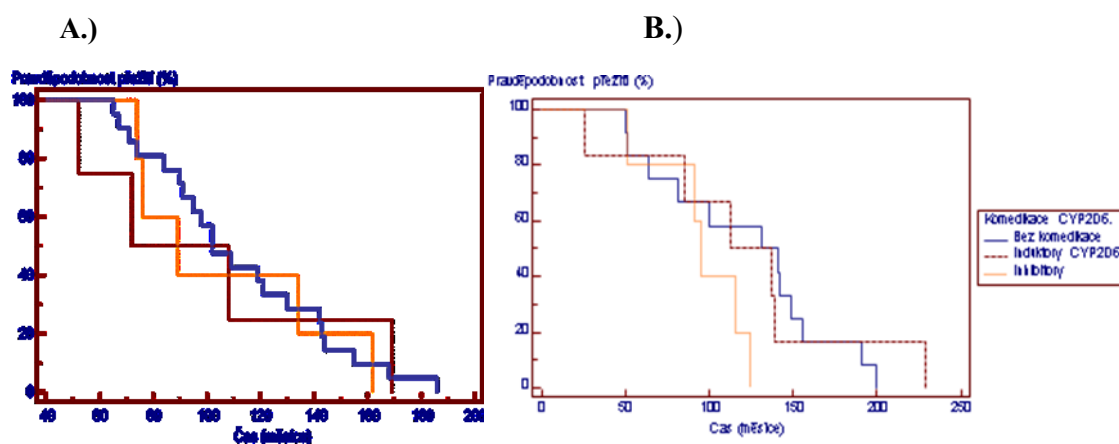
Nejdříve byly provedeny základní statistické analýzy pro celý sledovaný soubor, ve kterých jsme se v úvodu zaměřili obecně na vliv ko-medikace na TTE pouze v souboru progredujících pacientek. Na **Obr. 12** je, pro přehlednost srovnání jednotlivých skupin- bez ko-medikace (0), s ko-medikací induktory (1) a ko-medikací inhibitory CYP2D6 (2) a jejich vliv na délku sledování, použitý krabicový graf. Z grafu je zřejmý lehce delší medián TTE u pacientek s ko-medikací induktory CYP2D6 a srovnatelný medián TTE mezi pacientkami bez ko-medikace a s ko-medikací inhibitory CYP2D6. Dvěma použitými statistickými testy nebyla prokázána významná závislost ko-medikace na TTE (Levensův test $p = 0.377$ a ANNOVA $p = 0.731$).



Obr. 12: Krabicový graf vlivu komedikace na TTE v souboru progredujících pacientek (0 = bez sledované komedikace, 1 = komedikace substráty/induktory CYP2D6, 2 = komedikace inhibitory CYP2D6)

Zdroj: vlastní zpracování

Jelikož byl, v našich předešlých analýzách, prokázán signifikantní rozdíl TTE mezi stadiem T1 a pokročilejšími stadii T2 a více pouze v postmenopauzálním souboru, provedli jsme v tomto podsouboru rozbor vlivu ko-medikace na TTE odděleně pro stadia T1 a T2 až T4. Kaplan-Meierovi křivky pravděpodobnosti zkrácení TTE v závislosti na ko-medikaci pro hodnocené stadia jsou znázorněny na **Obr. 13 A a B**. Zatímco jsou na **Obr. A** pro stadium T1 ramena jednotlivých křivek v průběhu času bez jasné separace, je na křivkách **Obr. B** pro T2 a vyšší stadia mírně naznačena separace ramene při ko-medikaci inhibitory CYP2D6 se zkrácením TTE, ale bez prokázané statistické významnosti. S ohledem na relativně menší zastoupení souboru stadií T2 a více se opět domníváme, že se jedná o bias. Dále provedené multifaktoriální analýzy prokazovaly určitý trend ve vlivu ko-medikace inhibitory CYP2D6 na výsledek terapie tamoxifenem, ale rovněž bez jasné statistické závislosti.



Obr. 13: Kaplan-Meierova křivka pravděpodobnosti zkrácení TTE v postmenopauzálním souboru odděleně pro: A.) stadium T1 a B.) stadium T2 a více

Zdroj: vlastní zpracování

4.2.2 Primární analýza polymorfismů CYP2D6

V úvodu jsme opět sestavili přehlednou tabulku s počtem a procentuálním zastoupením jednotlivých fenotypů CYP2D6 v celém souboru a v obou sledovaných podsouborech (**Tab. 9**). Ze sestavené tabulky je zřejmé, že relativní zastoupení fenotypů CYP2D6 napříč sledovanými soubory je relativně konzistentní – UM 1 – 2 %, EM – 48 %, IM – 42 – 43 % a PM – 8 – 9 %. Toto rozvrstvení koreluje s Hardy – Weinbergovou rovnováhou v české populaci a literárně udávaným zastoupením. Pokud se zaměříme pouze na progredující pacientky, je zřejmé, že v celém sledovaném souboru nedošlo

u málo zastoupeného fenotypu UM (celkem 5 pacientek) k žádnému selhání terapie v sledovaném období. Dále pozorujeme, že v celé skupině progredujících pacientek kopíruje rozvrstvení fenotypů výše uvedené relativní zastoupení fenotypů CYP2D6, a tedy nepozorujeme očekávané odchylky ve smyslu vyššího zastoupení variantních alel mezi progredujícími pacientkami. Mezi progredujícími pacientkami v premenopauzálním podsouboru sice můžeme vypočítat vyšší relativní zastoupení IM (55%) a nižší zastoupení EM – 36%, ale toto připisujeme na vrub biasu při hodnocení malého souboru (11 progredujících pacientek). Navíc je zřejmé, že zastoupení PM napříč podsoubory nevykazuje žádnou relevantní odchylku při srovnání neselektovaných a progredujících pacientek. Primární statistická analýza, rovněž, neprokázala statisticky významný rozdíl rozvrstvení polymorfismů *CYP2D6* mezi skupinami progredujících a neprogredujících pacientek v celém sledovaném souboru ($p = 0.5615$, $\chi^2 = 2.053$).

Tab. 9: Zastoupení fenotypů CYP2D6

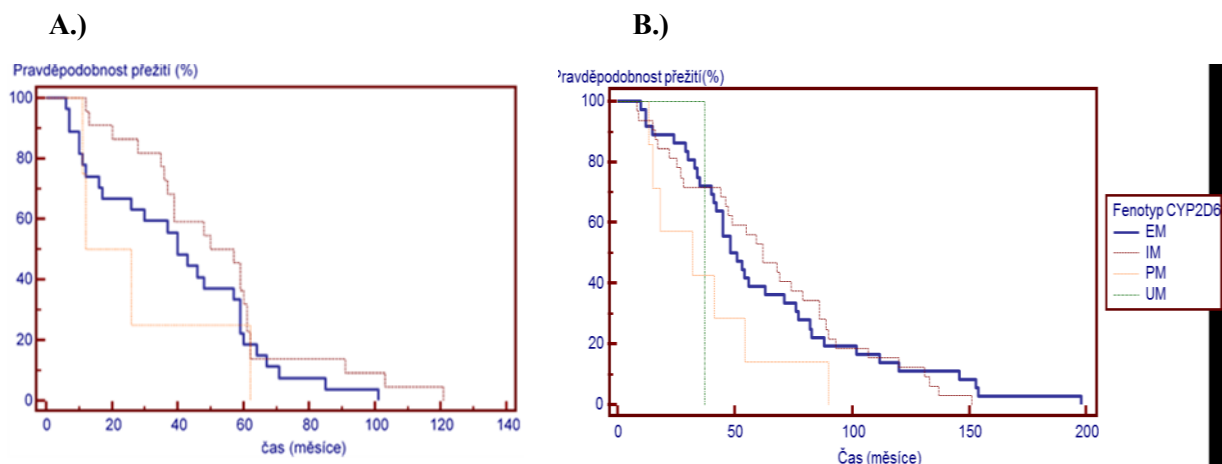
Fenotyp CYP2D6	UM No (%)	EM No (%)	IM / hetEM No (%)	PM No (%)
Premenopauzální	1 (1 %)	36 (48 %)	32 (42 %)	7 (9 %)
– progredující	-	4 (36 %)*	6 (55 %)*	1 (9 %)*
Postmenopauzální	4 (2 %)	89 (48 %)	80 (42 %)	14 (8 %)
– progredující	-	27 (51 %)*	22 (41 %)*	4 (8 %)*
Celý soubor	5 (2 %)	125 (48 %)	112 (43 %)	21 (9 %)
– progredující	-	31 (48 %)*	28 (43 %)*	5 (9 %)*

Zdroj: vlastní zpracování

POZN: „*“, – procentuální údaje v závorce v řádce „progredující“ vyjadřují procentuální podíl progredujících ER pozitivních pacientek z počtu progredujících 64 pacientek.

K ozřejnění vztahu TTE v jednotlivých fenotypech, byly následně pro oba podsoubory provedeny Kaplan – Meierovi analýzy (**Ob. 14 A, B**). Na obou grafech je sice nejistě naznačená separace ramene pro PM fenotyp od ramen pro IM a EM, ale následná statistická analýza neprokázala statistickou významnost ani v jednom podsouboru

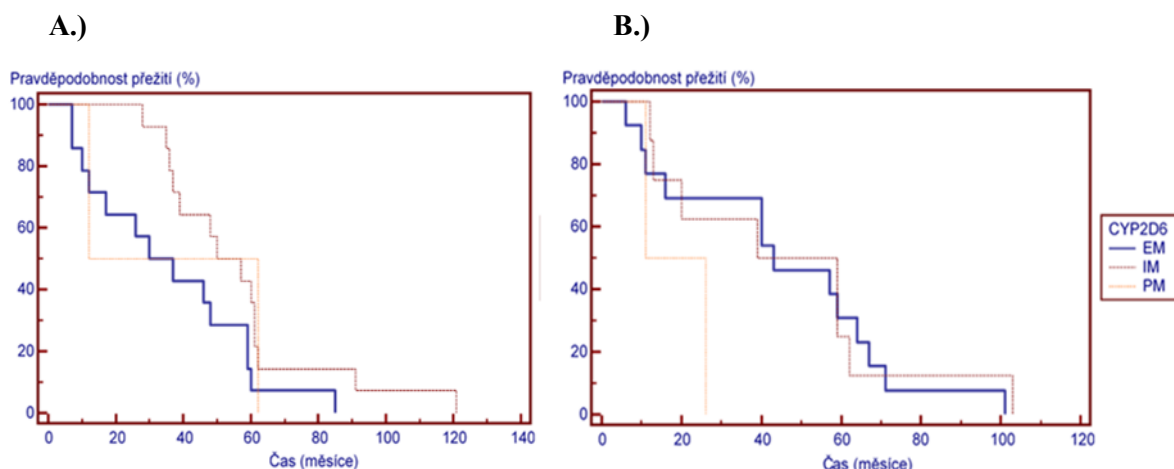
(premenopauzální pacientky: $p = 0.1955$, $\chi^2 = 4.6959$, postmenopauzální pacientky: $p = 0.2854$, $\chi^2 = 2.5076$).



Obr. 14: Kaplan – Meierovi křivky pravděpodobnosti TTE pro jednotlivé fenotypy CYP2D6 v podsouboru: A.) premenopauzálních pacientek, B.) postmenopauzálních pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

Pro jasně prokázaný vliv stadia nemoci v postmenopauzálním podsouboru, jsme provedli oddělenou analýzu pro stadium T1 a T2 a výše (**Obr. 15 A, B**). Z grafického znázornění je jasná separace ramene pro PM u vyšších stádií nemoci s tendencí ke zkrácení TTE, ale následné statistické analýzy jednoznačně neprokázaly předpokládanou významnost ani oddělení pro vyšší stadia nemoci ($p = 0.2455$, $\chi^2 = 2.8085$). Separace byla nejspíše způsobená relativně nízkým výskytem PM fenotypu ve skupině postmenopauzálních pacientek s vyšším stadiem nemoci.



Obr. 15: Kaplan Meierovi křivky pravděpodobnosti TTE pro jednotlivé fenotypy CYP2D6 podsouboru postmenopauzálních pacientek: A.) pro stadium T1, B.) pro stadia T2 a více

Zdroj: vlastní zpracování

4.2.3 Primární analýzy polymorfismů *ABCB1*

4.2.3.1 Polymorfismus *rs2032582 ABCB1* genu pro P-glykoprotein (*exon21*)

V *exonu21 ABCB1* genu pro P-gp jsme z důvodu výskytu dvou variantních alel (*T* a *A*) našli více než tři základní genotypové skupiny. S ohledem na přehlednost analýz byly některé analýzy provedeny po sloučení minoritních genotypů s ohledem na očekávaný fenotypový význam. Wild-typ genotyp je prezentován u nosiček pomocí dvou funkčních alel *GG* (*G2677G*, wt-homozygot). Nejčastější variantní alelou je *T*, proto rozlišujeme homozygota pro variantní alelu *TT* (vt / vt nebo vt – homozygot) respektive heterozygota *GT* (wt / vt). Minoritně byly v populaci zastoupeny nosičky variantní alely *A* s kombinacemi heterozygotů *TA* a *GA* a sporadicky zastoupeným homozygotem *AA*. V případě polymorfismů efluxní pumpy P-gp předpokládáme, že snížení transportní schopnosti P-gp u variantních polymorfismů povede k delšímu setrvání tamoxifenu a jeho aktivních metabolitů v buňce, a v konečném důsledku k vyšší efektivitě jeho terapie. V následující tabulce (**Tab. 10**) je přehledně znázorněno zastoupení jednotlivých polymorfismů s počtem a procentuálním zastoupením sledovaných fenotypů napříč oběma podsoubory a v celém zkoumaném souboru a s přehledným zastoupením polymorfismů v příslušných podskupinách progredujících pacientek. V celém zkoumaném souboru byl nejčetnějším fenotypem heterozygot *GT* s 50 % zastoupením, následován wt-homozygoty *GG* s 29 % výskytem a variantním homozygotem *TT* se 17 % četností. Variantní homo- a heterozygoti s minoritní vt alelou *A* se vyskytovali v průměru ve zhruba 2 – 3 %. Tyto výsledky opět korelují s Hardy – Weinbergovou rovnováhou v české populaci a literárně udávaným zastoupením fenotypů *ABCB1 rs2032582*. Rozvrstvení jednotlivých fenotypů v postmenopauzálním podsouboru zhruba kopíruje výše popsané rozvrstvení fenotypů v celém sledovaném souboru, pouze s nevýznamnými odchylkami. Ohledně zastoupení polymorfismů v premenopauzálním podsouboru lze naopak konstatovat, že pozorujeme vyšší relativní zastoupení wt-homozygotů *GG* – 36 %, ale zastoupení ostatních majoritních genotypů *GT* a *TT* je zhruba stejné (46 % a 16 %). Pokud se zaměříme pouze na progredující pacientky v celém souboru, vidíme nápadně vyšší zastoupení heterozygotů *GT* – 60 %, tedy přibližně desetiprocentní nárůst, a naopak poměrné snížení vt-homozygotů *TT* – 9 % a wt-homozygotů *GG* – 23 %. Trend jasného zvýšení zastoupení wt-homozygotů mezi progredujícími pacientkami je vyjádřen pouze v podsouboru premenopauzálních pacientek – *GG* je tady zastoupeno u 55 % pacientek!

ale zastoupení heterozygota *GT* je srovnatelné se zastoupením v celém souboru. Mezi 11 progredujícími premenopauzálními pacientkami nebyl zaznamenán žádný variantní homozygot, což opět nasvědčuje biasu při hodnocení malého souboru. S ohledem na nekonzistentní výsledky přehledové tabulky jsme se následnými statistickými analýzami pokusili nejasné vztahy a vlivy polymorfismu *exonu 21* ozřejmit.

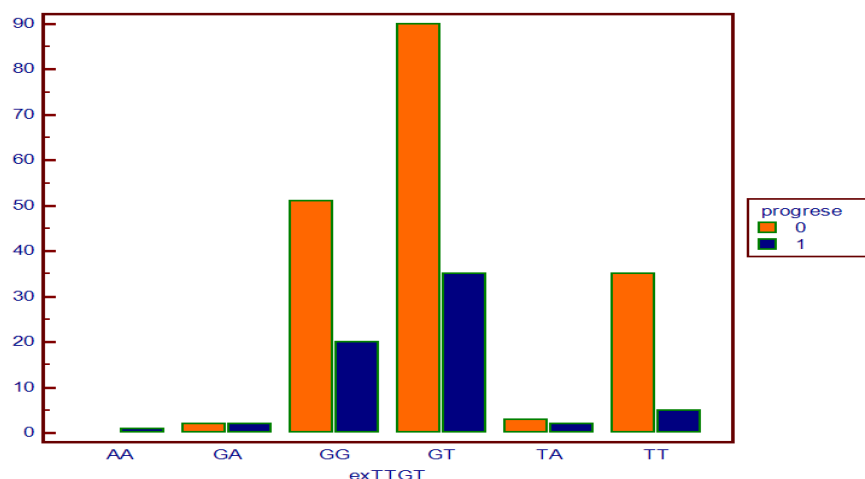
Tab. 10: Zastoupení polymorfismů *rs2032582 (exonu21) ABCB1* genu pro P-gp

Fenotyp	<i>GG</i> wt-homozygot No (%)	<i>GT</i> heterozygot No (%)	<i>GA</i> heterozygot No (%)	<i>TT</i> vt-homozygot No (%)	<i>AA + TA</i> vt-homozygot No (%)
Premenopauzální	27 (36 %)	35 (46 %)	2 (3 %)	12 (16 %)	-
- progredující	6 (55 %)*	5 (45 %)*	-	-	-
Postmenopauzální	46 (26 %)	91 (53 %)	3 (2 %)	29 (16 %)	5 (3 %)
- progredující	13 (24 %)*	30 (57 %)*	2 (4 %)*	5 (9 %)*	3 (6 %)*
Celý soubor	73 (29 %)	126 (50 %)	5 (2 %)	41 (17 %)	5 (2 %)
- progredující	13 (23 %)	35 (60 %)	2 (3 %)	5 (9 %)	3 (5 %)

Zdroj: vlastní zpracování

POZN: „*“, – procentuální údaje v závorce v řádce „progredující“ vyjadřují procentuální podíl progredujících ER pozitivních pacientek z počtu všech progredujících pacientek

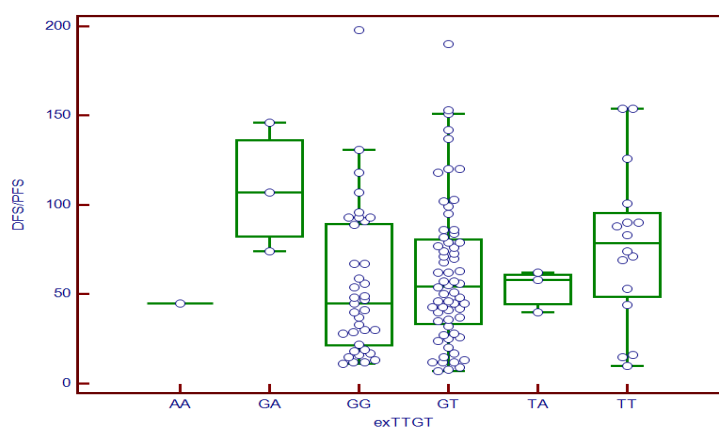
V úvodu bylo provedeno srovnání zastoupení sledovaných polymorfismů *exonu 21* mezi skupinou progredujících a neprogredujících pacientek v celém analyzovaném souboru. Jak je z předloženého sloupcového grafu (**Obr. 16**) zřejmé, poměrné zastoupení jednotlivých polymorfismů mezi oběma skupinami nenaznačuje vyšší počet wt-homozygotů mezi progredujícími pacientkami. Statistická analýza nepotvrdila statisticky významný vliv polymorfismů *exonu21* na míru „události“ (návratu respektive progrese onemocnění – TTE) mezi skupinami progredujících a neprogredujících pacientek ($p = 0.4854$, $\chi^2 = 1.446$).



Obr. 16: Sloupkový graf srovnávající zastoupení jednotlivých fenotypů exonu 21 u 0.) neprogredujících a 1.) progredujících pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

Dále byla provedená analýza vlivu jednotlivých polymorfismů exonu 21 na délku TTE ve skupině progredujících pacientek v celém souboru (**Obr. 17**). V grafu je naznačená tendence k prodloužení mediánu TTE pro heterozygotky *GT* a variantní homozygotky *TT*. Minoritní polymorfismy s variantní alelou *A* naznačují protichůdné výsledky, které ale s ohledem na nízkou četnost nelze brát v úvahu. Statistické hodnocení vzájemného vztahu zkoumaných polymorfismů exonu 21 a jejich vlivu na TTE nepotvrdilo statistickou významnost tohoto vztahu ($p = 0.494$, $F - \text{ratio} = 0.870$).

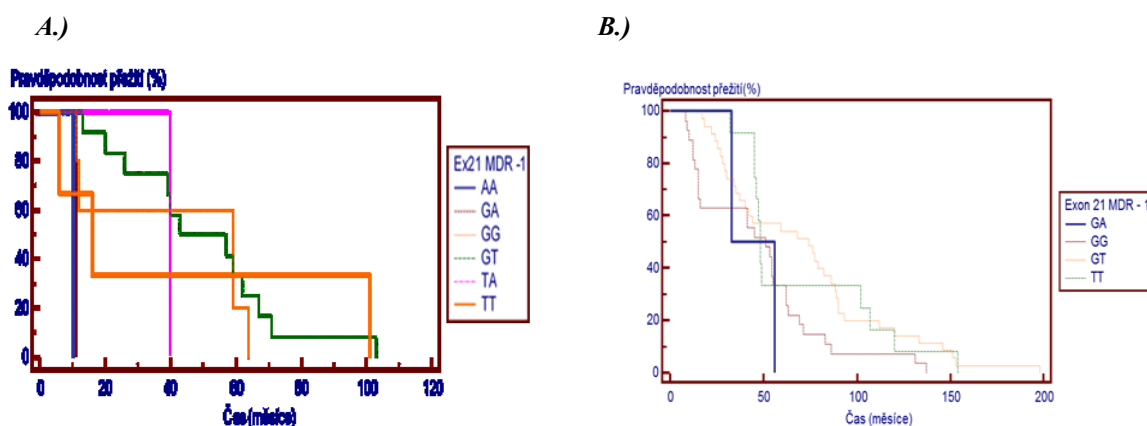


Obr. 17: Krabicový graf TTE pro jednotlivé sledované polymorfismy exonu 21

Zdroj: vlastní zpracování

V dalším kroku byla provedená analýza pravděpodobnosti TTE pro jednotlivé polymorfismy exonu 21 pomocí Kaplan-Meierovy analýzy odděleně pro oba podsoubory (**Obr. 18 A, B**). V premenopauzálním podsouboru (*A.*) byla patrná jasná separace ramene

pro GA ve smyslu zkrácení TTE, ale jelikož byl tento fenotyp zaznamenán pouze u 2 pacientek, jeho hodnocení nepovažujeme za relevantní. Genotyp GG (wt – homozygot) zpočátku jeví separaci ramene směrem ke zkrácení TTE, která s postupem času mizí. Následná statistická analýza neprokázala statistickou významnost ($p = 0.1006$, $\chi^2 = 6.2378$), pouze tendenci zkrácení TTE ve genotypu wt – homozygotů (GG) s předpokládanou vysokou výkonností P-gp a rychlým efluxem tamoxifenu. V podsouboru postmenopauzálních pacientek (B.) bylo v menšinových fenotypech AA, TA a GA malé množství pacientek, tedy i tyto křivky nedávají relevantní závěry. Křivka pro wt- homozygota (GG) jeví i tady určitou méně výraznou tendenci ke zkrácení TTE, ale Long-rang test potvrdil, na rozdíl od premenopauzálního souboru, statistickou významnost zkrácení TTE u GG wt – homozygotek ($p = 0.0357$, $\chi^2 = 11.9311$). S ohledem na naše základní analýzy, kterých závěrem byl jasně prokázán vlivem stadia nemoci na prognózu v postmenopauzálním souboru, jsme provedli oddělenou statistickou analýzu pro T1 stádium a T2 a vyšší stadia, která prokázala, v souladu s našim předpokladem, statisticky významné prodloužení TTE pro variantní alely GT a TT ($p = 0.0187$, $\chi^2 = 13.5544$) ale pouze pro T2 a vyšší stadia.



Obr. 18: Kaplan – Meierova křivka pravděpodobnosti TTE pro jednotlivé genotypy *exonu 21* v A.) premenopauzálním podsouboru a B.) postmenopauzálním podsouboru

Zdroj: vlastní zpracování

4.2.3.2 Polymorfismus *rs1045624 ABCB1* genu pro P-glykoprotein (*exon 26*)

V *Tab. 11* je přehledně znázorněn počet a procentuální zastoupení jednotlivých polymorfismů napříč oběma podsoubory a v celém zkoumaném souboru, jako i výskyt

polymorfismů *exonu 26* v příslušných skupinách progredujících pacientek. V celém sledovaném souboru bylo zaznamenáno nejvíce heterozygotek *C3435T* – 51 %, následováno 29 % wt – homozygotek (*CC*) a nejméně byly zastoupeny vt-heterozygotky (*TT*) – s 20 % zastoupením. V podsouboru postmenopauzálních pacientek nebyl v relativním zastoupení jednotlivých polymorfismů pro *exon 26* zaznamenán žádný významný posun a rozvrstvení polymorfismů zhruba koreluje s jejich výskytem v celém souboru. V podsouboru premenopauzálních pacientek byl rovněž nejfrekventovanějším fenotypem heterozygot, s mírně vyšším zastoupením – 58 % (44 pacientek) a poměrným snížením výskytu v řadách obou homozygotů – 24 % wt-heterozygotek a 18 % vt-homozygotek. Obecně můžeme opět konstatovat, že rozvrstvení polymorfismů koreluje s Hardy-Weinbergovou rovnováhou i literárně udávaným zastoupením polymorfismů *exonu 26* v české populaci. Jiná situace je v případě rozboru skupin progredujících pacientek. Zatímco nenacházíme žádnou významnou odchylku u progredujících pacientek v celém souboru, v postmenopauzálním podsouboru je mezi progredujícími pacientkami lehce vyšší zastoupení vt-heterozygotů (25 %). U 11 progredujících pacientek v premenopauzálním podsouboru bylo zřejmé vyšší procentuální zastoupení wt-homozygotů 45% (ve srovnání s 24 – 29 % v ostatních souborech) s jasně nižším zastoupením variantních fenotypů (heterozygoti 45 % a vt-homozygoti 10 %), což jasně odpovídá našemu předpokladu, že u pacientek s plně funkčním P-gp (wt – homozygotky) bude na podkladě efektivního vylučování tamoxifenu a jeho metabolitů z buněk nižší efektivita terapie.

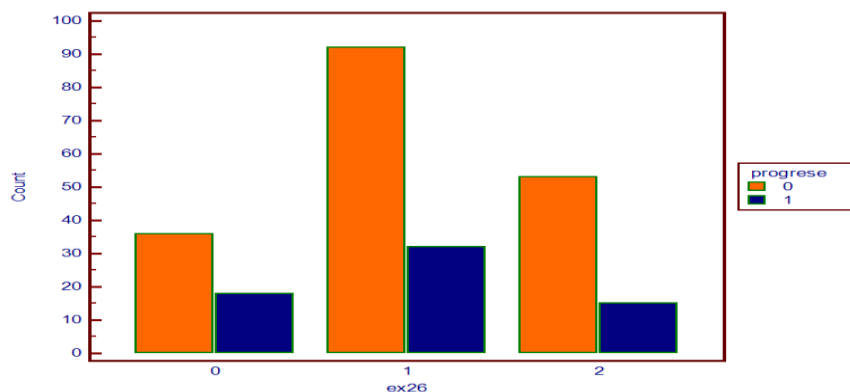
Tab. 11: Zastoupení fenotypů *rs1045624 ABCB1* genu pro P gp (*exon26*)

Fenotyp <i>exon26</i> <i>C3435C/T</i>	C3435C (wt-homozygot) No (%)	C3435T (heterozygot) No (%)	T3435T (vt-homozygot) No (%)
Premenopauzální	18 (24 %)	44 (58 %)	14 (18 %)
- progredující	5 (45 %)	5 (45 %)	1 (10 %)
Postmenopauzální	55 (31 %)	83 (48 %)	37 (21 %)
- progredující	14 (26 %)	26 (49 %)	13 (25 %)
Celý soubor	73 (29 %)	127 (51 %)	51 (20 %)
- progredující	19 (30 %)	31 (48 %)	14 (22 %)

Zdroj: vlastní zpracování

POZN: „*,“ – procentuální údaje v závorce v řádce „progredující“ vyjadřují procentuální podíl progredujících ER pozitivních pacientek z počtu progredujících 53 pacientek.

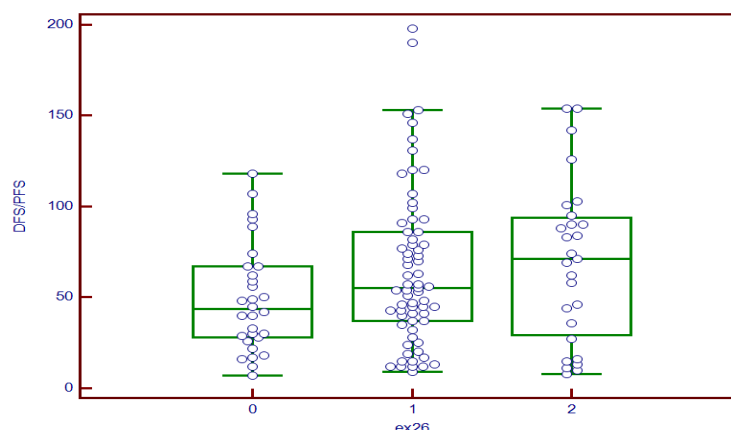
Ve snaze zjistit, zda existuje odchylka v zastoupení jednotlivých genotypů ve skupině progredujících pacientek, jsme v úvodu našich statistických analýz opět použili základní srovnávací statistickou analýzu mezi skupinou progredujících a neprogredujících pacientek v celém souboru – zobrazeno sloupcovým grafem (**Obr. 19**). Poměrné zastoupení jednotlivých polymorfismů mezi oběma skupinami naznačuje nesignifikantně vyšší poměrné zastoupení wt- homozygotek mezi progredujícími pacientkami ($p = 0.5878$, $\chi^2 = 1.063$).



Obr. 19: Sloupcový graf srovnávající zastoupení jednotlivých fenotypů exonu26 mezi skupinou progredujících (0-oranžově) a neprogredujících (1-modře) pacientek (0 = wt- homozygot (C3435C), 1 = heterozygot (C3435T), 2 = vt-homozygot (T3435T))

Zdroj: vlastní zpracování

Krabicový graf (**Obr. 20**) vztahu jednotlivých polymorfismů *exonu 26* na TTE ve skupině progredujících pacientek v celém sledovaném souboru naznačuje určitý trend k prodloužení mediánu TTE v pořadí od wt-homozygotek přes heterozygotky k nejdelšímu TTE pro vt-homozygotky, což by podporovalo naši hypotézu, ale statistické analýzy provedeny dvěma statistickými testy shodně neprokázaly statistickou významnost tohoto vztahu (Levensenův test equality variací: $p = 0.333$, ANOVA: $p = 0.445$, F-ratio = 0.824).

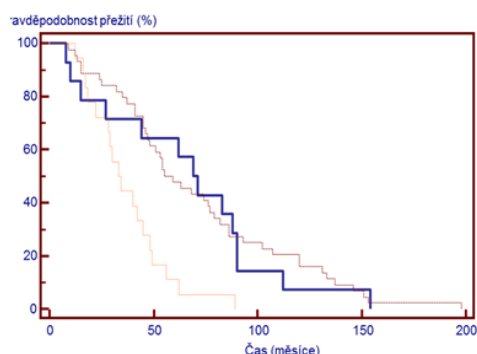


Obr. 20: Krabicový graf vyjadřující vývoj TTE pro jednotlivé fenotypy *exonu 26* u progredujících pacientek v celém sledovaném souboru. (0 = wt-homozygot (C3435C), 1 = heterozygot (C3435T), 2 = vt-homozygot (T3435T))

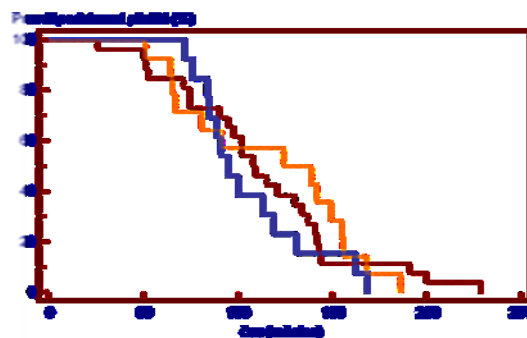
Zdroj: vlastní zpracování

Ve snaze ozřejmit potenciál jednotlivých polymorfismů zvyšovat riziko „události“, tedy recidivy nebo progrese onemocnění, byly sestrojeny Kaplan – Meierovy křivky (**Obr. 21 A, B**). Kaplan – Maierova křivka pro premenopauzální pacientky (**A.**) ukazuje jasnou separaci ramene pro fenotyp wt-homozygotek s tendencí pro zkrácení TTE, ve srovnání s fenotypy s variantní alelou (heterozygoti (C3435T) a vt – homozygoti (T3435T)). Statistická analýza potvrdila statistickou významnost tohoto vztahu, prokázané zkrácení TTE u wt-homozygotek (C3435C) ($p = 0.012$, $\chi^2 = 13.4831$) s HR pro souhrn pacientek s minimálně jednou variantní alelou 0.69 (95% CI 0.21 – 2.31). Obdobné křivky pro postmenopauzální podsoubor (**B.**), na rozdíl od křivek pro premenopauzální pacientky, neukazují jasnou separaci ramen v žádném logickém sledu. Můžeme pouze dedukovat určitou tendenci k prodloužení TTE pro variantní homozygotky, kterou ale následné analýzy Long-rang testem neprokázali ($p = 0.6591$, $\chi^2 = 0.8337$).

A.)



B.)

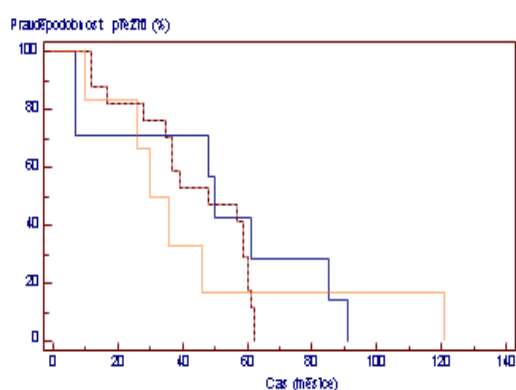


Obr. 21: Kaplan – Meierovy křivky TTE pro polymorfismy exonu26 v podsouboru A.) premenopauzálních pacientek a B.) postmenopauzálních pacientek

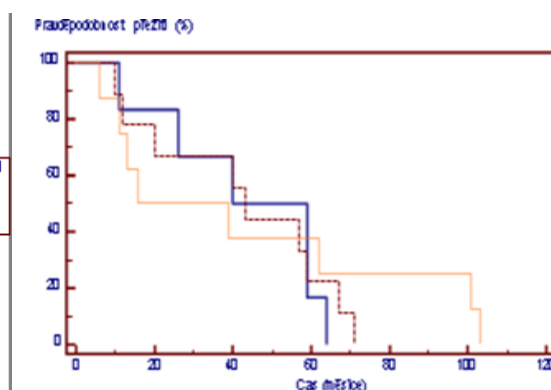
Zdroj: vlastní zpracování

Kaplan-Meierova křivka (**Obr. 22 A a B**) a následné analýzy vlivu polymorfismu *exonu 26* odděleně pro stadia T1 a T2 a více v celém sledovaném souboru naznačovaly tendenci prodlužování TTE v předpokládaném sledu při zastoupení variantních alel, tj. od wt-homozygotek přes heterozygotky k vt-homozygotkám, pouze pro vyšší stadia, ale následná statistická analýza pro T2 a vyšší stadia potvrdila pouze nejistý trend ke statistické významnosti ($p = 0.2455$, $\chi^2 = 2.8085$).

A.)



B.)



Obr. 22: Kaplan-Meierova analýza pravděpodobnosti prodloužení TTE pro fenotypy exonu 26 ve stadiu T1 a B.) ve stadiu T2 a vyšším

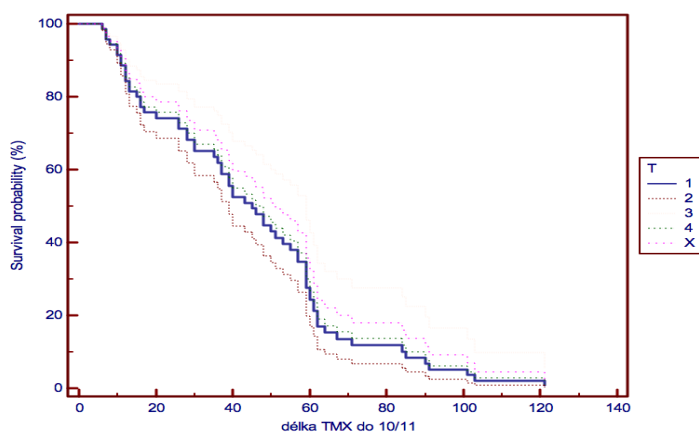
Zdroj: vlastní zpracování

4.2.4 Multifaktoriální analýza vztahů zkoumaných znaků a polymorfismů

Rozporuplné výsledky a spíše statistické trendy, než signifikantní výsledky, nás vedly k předpokladu, který se ve světle posledních vyjádření mnohých výzkumných týmů a odborných společností ukazuje jako nová cesta farmakogenomiky tamoxifenu, a to že výsledek terapie tamoxifenem ovlivňují spíše vzájemné vazby několika znaků/polymorfismů, než některý konkrétní znak sám o sobě – tzv. **myšlenka „komplexního genotypu“**. Pro posouzení významnosti vlivu několika kofaktorů na efektivitu terapie tamoxifenem jsme na konci našich statistických analýz provedli hodnocení pomocí Coxových proporcionálních hazard analýz. Cílem provedených Coxových analýz bylo ozřejmit často sporné a protichůdné výsledky primárních analýz našich podsouborů, nebo naopak potvrdit platnost zřejmých statistických výsledků ve světle dalších kofaktorů, které by se mohly podílet na efektivitě terapie tamoxifenem. Z tohoto důvodu jsou zde popsány Coxovy analýzy pro jednotlivé podsoubory a celý soubor různé – byly voleny pro jednotlivé podsoubory s ohledem na předchozí výsledky a dle toho, byly voleny i odpovídající kofaktory.

V demografickém rozboru našeho souboru byla potvrzena statistická významnost iniciálního stadia nemoci, ale pouze v postmenopauzálním podsouboru. Stadium nemoci je známý a obecně uznávaný nezávislý prognostický faktor pro většinu nádorových onemocnění obecně, což platí i pro karcinom prsu. Pro analýzu vlivu stadia na efekt terapie TMX (tj. TTE) jsme volili negenetické kovariáty, u kterých rovněž předpokládáme jejich vliv na efektivitu terapie tamoxifenem – tj. míru exprese ER a PR a ko-medikaci induktory nebo inhibitory CYP2D6. V předešlých analýzách byl v postmenopauzálním souboru potvrzen signifikantní vztah mezi iniciálním stadiem a TTE ($p = 0.0313$, $\chi^2 = 13.854$). Obdobná Coxova analýza v premenopauzálním podsouboru, který byl z hlediska stadia méně konzistentní (jak popsáno výše v příslušné kapitole), neprokázala statisticky významný vliv ($p = 0.9866$, $\chi^2 = 0.346$) a nebyl zaznamenán ani trend jednotlivých kovariát k významnosti. Protože nelze předpokládat, ani z literárních zdrojů vyčíst, že by vliv stadia nemoci byl mezi premenopauzálními a postmenopauzálními pacientkami různý, zaměříme se na jeho bližší analýzu v celém sledovaném souboru. Křivka pravděpodobnosti TTE v závislosti na stadiu nemoci v součinnosti s ostatní sledovanými kovariáty pro celý soubor je na **Obr. 23**. Z grafu je zřejmá separace ramena pro T3 stádium, ale toto stádium bylo pro malé zastoupení patientek v obou podsouborech

nehodnotitelné. Celková analýza vlivu analyzovaných negenetických kovariát rovněž neprokázala žádný statisticky významný vliv na TTE ($p = 0.8039$, $\chi^2 = 4.555$). Za zmínku stojí pouze určitá tendence k ovlivnění pravděpodobnosti TTE u ko-medikace inhibitory CYP2D6 ($p = 0.1714$, 95% CI = 0.8151 – 3.2072).

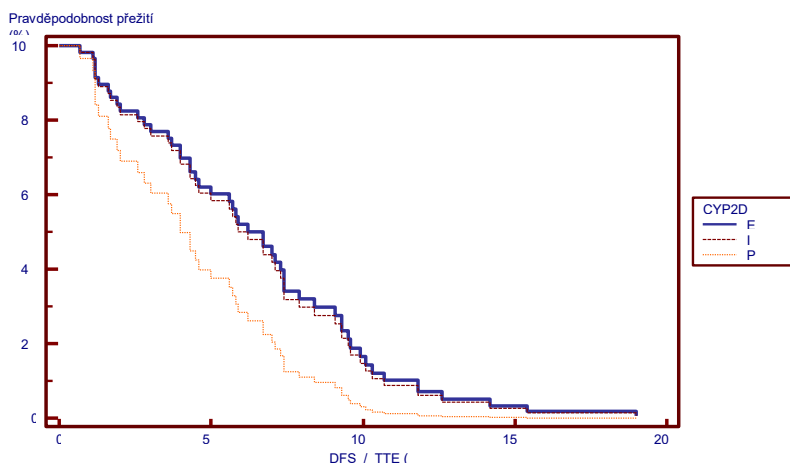


Obr. 23: Coxova hazard analýza vlivu iniciačního stadia nemoci na TTE s negenetickými kofaktory v celém zkoumaném souboru

Zdroj: vlastní zpracování

Obecně nebyl předešlými analýzami zaznamenán žádný statisticky signifikantní vliv polymorfismů *CYP2D6* na pravděpodobnost nebo dobu objevení „události“ (TTE). Byl pouze zaznamenán určitý trend zkrácení TTE u PM v premenopauzálním souboru ($p = 0.1955$). Rovněž byl opakovaně zaznamenán obdobný trend ke statistické významnosti pro ko-medikaci CYP2D6 induktory. Coxovou analýzu pro vliv polymorfismů *CYP2D6* na TTE jsme se nejdříve pokusili provést v součinnosti s expresí hormonálních receptorů (ER a PR) a ko-medikace ovlivňující funkci CYP2D6 (induktory a inhibitory CYP2D6) v podsouboru postmenopauzálních pacientek. Z křivky na **Obr. 24** je zjevná separace ramen pro variantní homozygotky (PM) od ramen pro wt- homozygotky (EM) a heterozygotky (IM). Po cca 100 měsících, což byla průměrná doba sledování ve skupině progredujících postmenopauzálních pacientek v našem podsouboru, se tato separace vytrácí. Statistickou analýzou nebyla prokázána statistická významnost vlivu zkoumaných kovariát na TTE ($p = 0.8047$, $\chi^2 = 3.033$). Z výsledků provedených analýz je naznačen pouze určitý trend ke statistické významnosti vlivu exprese ER ($p = 0.3662$, 95%CI = 0.9824 – 1.0065), a rovněž pouze trend k vyšší pravděpodobnosti TTE u pacientek s ko-medikací inhibitory CYP2D6 při léčbě

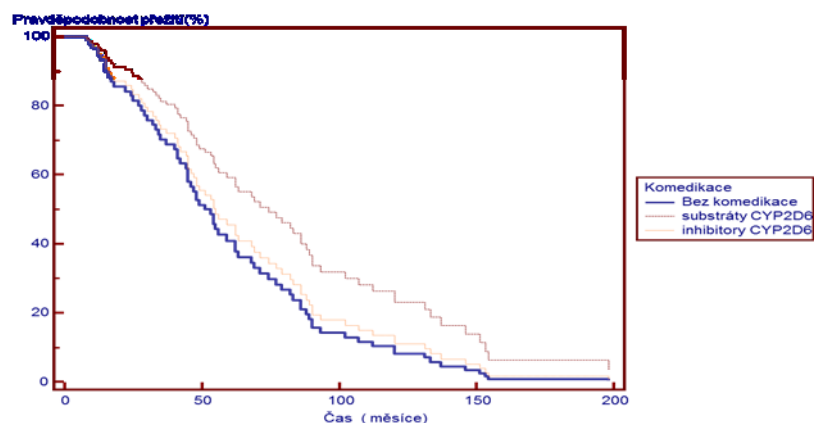
tamoxifenem ($p = 0.3575$, 95% CI = 0.6751 – 2.9889). Toto potvrzuje výsledky našich předešlých analýz.



Obr. 24: Coxova analýza vlivu fenotypu CYP2D6 na TTE v součinnosti s dalšími kovariáty (exprese ER, PR a ko-medikace) v podsouboru postmenopauzálních pacientek. (Fenotypy CYP2D6 označeny jako: E – EM, I – IM, P – PM)

Zdroj: vlastní zpracování

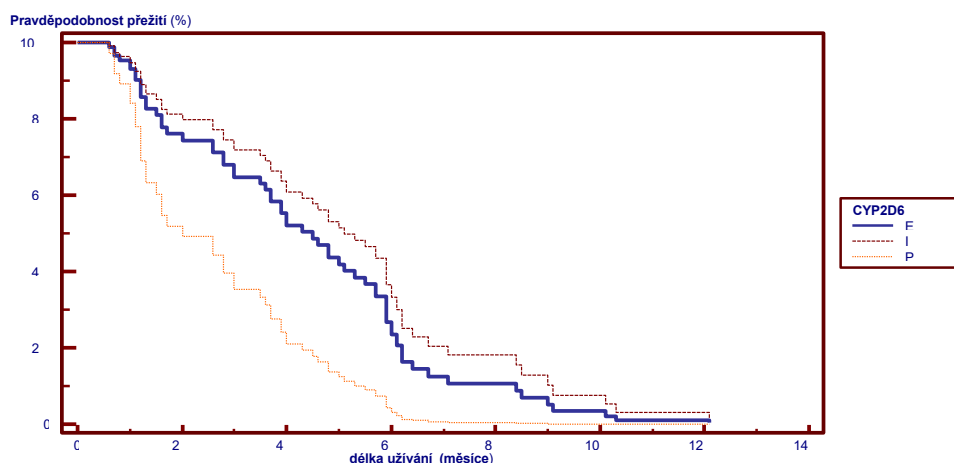
Při Coxových analýzách zaměřených na vliv ko-medikace inhibitory nebo induktory CYP2D6 na TTE jsme provedli obdobnou analýzu, ale tentokrát pro podsoubor premenopauzálních pacientek s kofaktory exprese ER a PR a polymorfismy CYP2D6 (**Obr. 25**). Z grafu je zřejmá mírná separace křivek u pacientek s ko-medikací substráty (induktory) CYP2D6 od pacientek bez ko-medikace ovlivňující funkci CYP2D6 a ko-medikace inhibitory CYP2D6. Statistická analýza neprokázala významnost vlivu induktorů respektive inhibitorů CYP2D6 na TTE, ale opět byl naznačen určitý trend ke statistické významnosti (premenopauzální: $p = 0.1975$, 95%CI = 0.2147 – 1.3690, postmenopauzální: $p = 0.3575$, 95% CI = 0.6751 – 2.9889).



Obr. 25: Coxova analýza vlivu ko-medikace na TTE v součinnosti s dalšími kovariáty (expres ER a PR a fenotyp CYP2D6) v podsouboru premenopauzálních pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

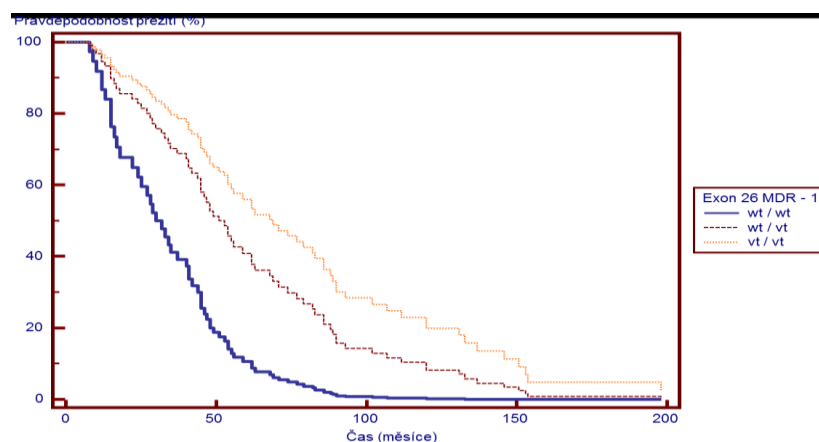
S ohledem na komplexní studium biomarkerů jsme koncipovali i další Coxovy analýzy vlivu polymorfismů *CYP2D6* a *ABCB1* genů na TTE (tvz. „genetické kovariáty“). Z Coxovy analýzy vlivu *CYP2D6* a ostatních sledovaných polymorfismů na TTE pro celý soubor (**Obr. 26**) je zřejmá obdobná separace ramen pro variantní homozygotky (PM), bez separace ramen pro wt- homozygotky (EM) a heterozygotky (IM), která byla při analýzách *CYP2D6* popsána i v součinnosti s negenetickými kovariáty. S časem se tato separace postupně vytrácí a ramena pro všechny 3 fenotypy (EM, IM, PM) začínají opět po 100 měsících splývat. Statistickou analýzou všech zkoumaných kovariát nebyla prokázána statistická významnost, ale na rozdíl od předešlých analýz, byl zaznamenán těsnější statistický trend k významnosti ($p = 0.1555$, $\chi^2 = 13.159$), z čehož usuzujeme, že vzájemná součinnost sledovaných genetických kovariát se ve větší míře podílí na účinnosti terapie tamoxifenem, než tomu bylo u výše sledovaných negenetických kovariátů. Opět byla zaznamenána zřejmá statistická signifikance vlivu u minoritního variantního polymorfismu *AA rs2032582 ABCB1* genu pro P-gp ($p = 0.164$, $95\%CI = 1.6592 - 132.7367$), ale s ohledem na velmi malé zastoupení nosiček tohoto polymorfismu, byla tato již v předešlých analýzách hodnocena jako možný bias. Trend ke statistické významnosti byl pozorován, opět v souladu s předešlými analýzami, u PM polymorfismu *CYP2D6* ($p = 0.0899$, $95\%CI = 0.8875 - 5.5506$), a dále u majoritního wt- homozygota pro alelu T v exonu21 ($p = 0.0913$, $95\% CI = 0.1065 - 1.1747$).



Obr. 26: Coxova analýza vlivu polymorfismů *CYP2D6* na TTE v součinnosti s ostatními genetickými kovariáty (polymorfismy *ABCB1*) v celém souboru

Zdroj: vlastní zpracování

Jedním ze zásadních výsledků naší práce je statisticky signifikantní zkrácení TTE u wt- homozygotek pro *rs1045624 ABCB1* pro P-gp v premenopauzálním souboru ($p = 0.0358$, $\chi^2 = 16.496$). Následující Coxovu analýzu jsme proto zaměřili na vliv polymorfismu *rs1045624 ABCB1* v komplexu s ostatními genetickými kovariáty v premenopausálním souboru (**Obr. 27**). Provedená analýza jednoznačně prokázala naše předešlé výsledky a potvrdila statistickou významnost vlivu wt-homozygotů v *exonu 26* na zkrácení TTE ($p = 0.0218$, $95\%CI = 1.1425 - 5.1949$). Opětovně byla zaznamenána tendence ke statistické významnosti pro PM *CYP2D6* ($p = 0.2139$, $95\%CI = 0.4787 - 27.9087$).

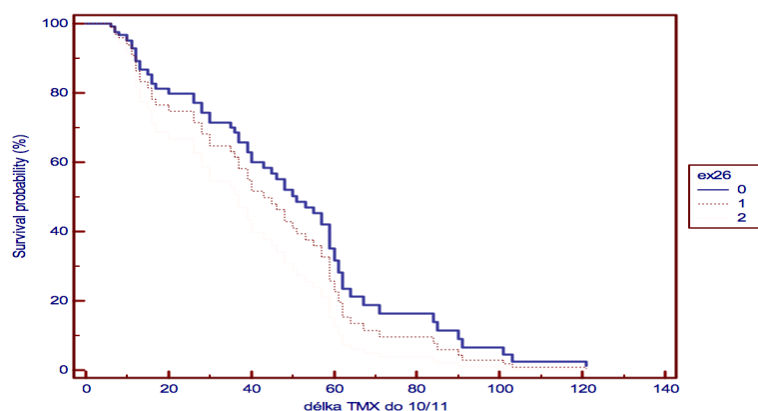


Obr. 27: Coxova analýza vlivu polymorfismů *rs1045624 ABCB1* v součinnosti s ostatními genetickými kovariáty (polymorfismů pro *CYP2D6* a *rs2032582 ABCB1*) v podsouboru premenopauzálních pacientek

Zdroj: vlastní zpracování

S ohledem na opakovaně prokázaný významný vliv polymorfismů *exonu* 26 na TTE v premenopauzálním souboru, bylo cílem další Coxovy analýzy ozřejmit, zda prokážeme statistickou významnost polymorfismů *exonu* 26 v součinnosti s ostatními genetickými i negenetickými kovariáty (tj. exprese ER a PR, iniciační stadium nemoci, polymorfismy *CYP2D6* a sledované polymorfismy *ABCB1*) v celém sledovaném souboru. Ze sestavené Coxovy analýzy (**Obr.28**) není zřejmá žádná významná separace ramen pro jednotlivé polymorfismy *exonu* 26. Statistickou analýzou všech zkoumaných kovariátů nebyla prokázána statistická významnost vlivu zkoumaných kovariátů a nebyl ani vyjádřen významný statistický trend ovlivnění TTE pro sledované polymorfismy *exonu* 26 ($p = 0.3466$, $\chi^2 = 16.548$). Ze subanalýz byla, opětovně, zaznamenána statistická signifikance pro minoritní variantní polymorfismu *AA exonu* 21 (výskyt max ve 2 % sledované populace) ($p = 0.0156$, 95%CI = 1.7840 – 220.2494) a opět minoritního heterozygota pro 2 variantní alely *TA exonu* 21 ($p = 0.0364$, 95%CI = 1.1570 – 62.4497), hodnocené již v předešlých analýzách, s ohledem na malý výskyt, jako možný bias. Trend ke statistické významnosti byl pozorován u vlivu obou variantních polymorfismů *CYP2D6* (PM: $p = 0.2555$, 95%CI = 0.6608 – 4.8230 a tentokrát i IM: $p = 0.1634$, 95%CI = 0.3366 – 1.1986). U polymorfismů *exonu* 21 byl zaznamenán, mimo výše popsané, hodnotitelný trend ke statistické významnosti pouze u variantního homozygota *TT* ($p = 0.1218$, 95% CI = 0.1010 – 1.3020). Opětovně byl zaznamenán trend ke statistické významnosti u málo zastoupeného T3 stadia nemoci ($p = 0.1553$, 95% CI = 0.0470 - 1.6153), který rovněž považujeme spíše za bias. Provedenou analýzou nebyl

prokázán statisticky významný vliv polymorfismu *exonu 26* na efekt terapie tamoxifenem v celém sledovaném souboru v součinnosti s dalšími významnými genetickými a negenetickými kofaktory.

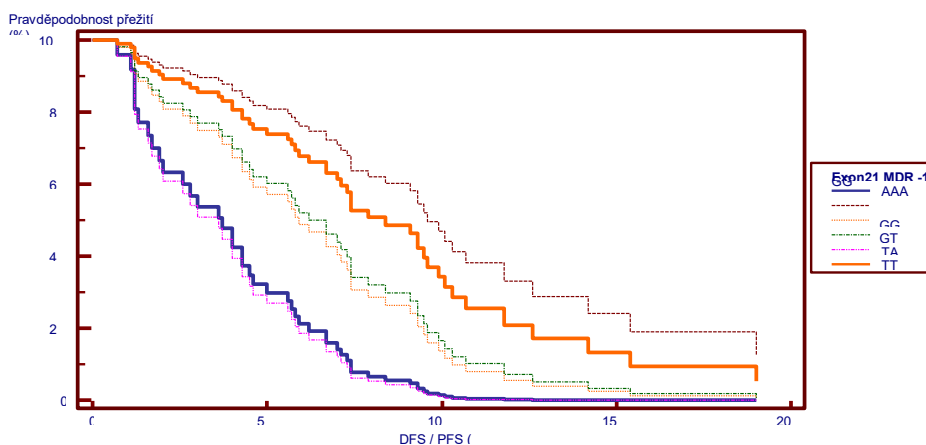


Obr. 28: Coxova analýza vlivu polymorfismů *rs1045624 ABCB1* v součinnosti s ostatními genetickými a negenetickými kovariáty (polymorfismy *CYP2D6* a *rs2032582 ABCB1*, ko-medikace, exprese ER a PR a stadium) celém sledovaném souboru (0 = wt- homozygotky C3435C, 1 = heterozygot C3435T, 2= vt-homozygot T3435T)

Zdroj: vlastní zpracování

V postmenopauzálním souboru bylo v průběhu primárních analýz zaznamenáno statisticky významné zkrácení TTE u wt-homozygotek *rs2032582 ABCB1*, které korespondovalo s našimi hypotézami snížení efektivity terapie TMX v prostředí plně funkční efluxní pumpy P-gp. Proto jsme další Coxovou analýzu vlivu polymorfismu *exonu 21* na TTE v součinnosti dalších genetických kovariát provedli v úvodu pouze v postmenopauzálním souboru (**Obr. 29**). Křivky pro jednotlivé varianty *exonu 21* vykazují tendenci k separaci ramene četně zastoupeného variantního homozygota *TT* směrem k prodloužení TTE, na rozdíl od wt- homozygota (*GG*) a heterozygota (*GT*), u nichž ramena téměř splývají. Výraznou tendenci k prodloužení TTE u variantních heterozygotů *GA* (pouze 3 pacientky v celém souboru) přisuzujeme opět možné chybě malých čísel, stejně jako nejkratší TTE u minoritních variantních fenotypů *AA* a *TA*. Statistickou analýzou všech zkoumaných kovariát nebyla prokázána statistická významnost vlivu analyzovaných genetických kofaktorů na TTE ($p = 0.6548$, $\chi^2 = 6.830$). Z výsledků analýzy bylo možné vypožorovat, opět pouze určité trendy ke statistické významnosti. Z grafu zřejmá zjevná separace ramen pro *GA* a *TA* varianty byla podpořena určitými nevýznamnými trendy ke statistické významnosti u *GA* ($p = 0.3258$, 95%CI = 0.0725 - 2.3766) a *TA* ($p = 0.2501$, 95%CI = 0.5205 – 12.5613). Z hodnotitelných kovariát

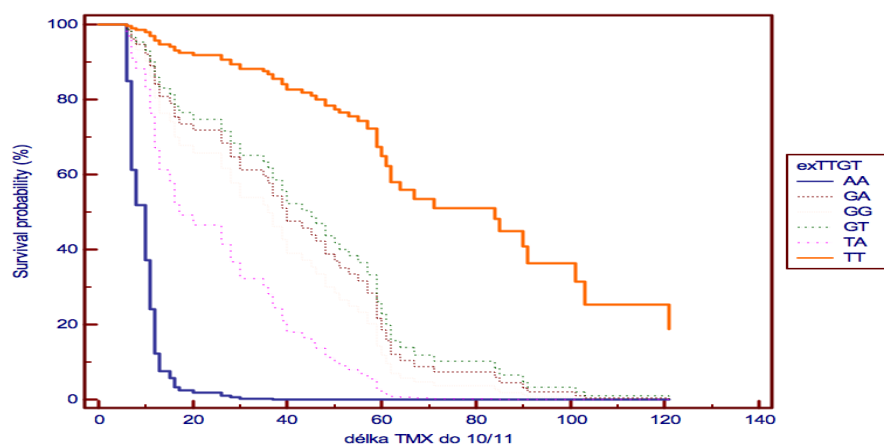
je zaznamenán trend k statistické významnosti pro vt-homozygota *TT* ($p = 0.3575$, 95% CI = 0.1912 – 1.8104) a variantní homozygotky *CYP2D6* (PM) ($p = 0.1847$, 95% CI = 0.6857 – 7.2567).



Obr. 29: Coxova analýza vlivu polymorfismů *rs2032582 ABCB1* v postmenopauzálním souboru

Zdroj: vlastní zpracování

S cílem ozřejmit význam vlivu všech námi sledovaných faktorů s předpokládaným vlivem na účinnost terapie tamoxifenem, jsme pro celý soubor provedli analýzu vlivu polymorfismu *exonu 21* na TTE v součinnosti s dalšími genetickými i negenetickými kovariáty (sledované polymorfismy *CYP2D6* a *rs1045624*, ko-medikace, stadia nemoci, exprese ER a PR) (**Obr. 30**). Z křivek Coxovy analýzy je zjevná separace ramene pro vt-homozygota (*TT*) od ostatních zkoumaných polymorfismů. Statistickou analýzou všech zkoumaných kovariát nebyla prokázána statistická významnost, ale opět pouze jasně vyjádřený trend ke statistické významnosti polymorfismů *exonu21* ($p = 0.1882$, $\chi^2 = 14.877$). Ze zkoumaných kovariát byla, v souladu s našimi předešlými závěry, zaznamenána statistická signifikance pouze u minoritních vt-homozygotů *AA* ($p = 0.0130$, 95%CI = 1.8249 – 149.2781) a trend ke statistické významnosti byl pozorován u vlivu variantních fenotypů *CYP2D6* (PM: $p = 0.1011$, 95%CI = 0.8628 – 5.5002 a IM: $p = 0.2906$, 95%CI = 0.4061 to 1.3069), dále u majoritního vt-homozygota pro *exon 21 TT* ($p = 0.0891$, 95% CI = 0.1049 – 1.1670), wt-homozygota *GG exonu 21* ($p = 0.1761$, 95% CI 0.7863 – 3.7800) a ko-medikace inhibitory *CYP2D6* ($p = 0.1802$, 95% CI = 0.7916 – 3.5277).



Obr. 30: Coxova analýza vlivu polymorfismů *rs2032582 ABCB1* na TTE v součinnosti s genetickými kovariáty a ko-medikací v celém souboru

Zdroj: vlastní zpracování

4.3 Analýza výskytu nežádoucích účinků při terapii tamoxifenem

4.3.1 Demografie a popis pacientek s nežádoucími účinky

Sledované nežádoucí účinky (NÚ) byly zaznamenány celkem u 81 pacientek, z nichž mělo 56 tzv. gynekologické NÚ (hyperplasie endometria, 1 karcinom dělohy, a vasomotorické efekty – návaly) a 24 žen žilní komplikace (hluboká venózní trombóza nebo plicní embolie). U jedné pacientky byly zaznamenány oba druhy komplikací. Věk v době diagnózy byl v celém souboru pacientek s NÚ a u pacientek s gynekologickými NÚ srovnatelný, a pohyboval se kolem padesáti let, na rozdíl od pacientek se žilními NÚ, u kterých byl věkový medián padesátosm let. Délka sledování byla opět srovnatelná v neselektovaném souboru a v podsouboru s gynekologickými NÚ 74 – 78 měsíců, a opět delší v podsouboru se žilními komplikacemi – 85 měsíců. Průměrná doba do objevení gynekologických NÚ byla 21 měsíců (rozmezí 6 – 78) a žilních komplikací 25 měsíců (rozmezí 8 – 60). Můžeme tedy konstatovat, že oba druhy komplikací se objevovaly v průměru po přibližně 2 letech od zahájení užívání TMX, ale s velkou variabilitou (6 měsíců až 7 let). U jediné pacientky s oběma druhy komplikací byla délka užívání TMX kratší – 16 měsíců. Z celkového počtu pacientek s NÚ, bylo 11 pacientek premenopauzálních a 54 pacientek postmenopauzálních.

V podsouboru premenopauzálních pacientek bylo zaznamenáno celkem 11 (15 %) pacientek s výskytem NÚ přisuzovaných užívání tamoxifenu. Z toho bylo 10 pacientek s gynekologickými NÚ a 1 pacientka s venózními komplikacemi (tato byla též nosička Leidenské mutace!). Věkem v době diagnózy se premenopauzální pacientky s NÚ vzájemně nelišily, věkový medián byl 42 – 44 let. Průměrná délka sledování byla paradoxně v podsouboru premenopauzálních pacientek s gynekologickými NÚ významně delší (90 měsíců), než v podsouboru pacientek bez NÚ (66 měsíců) a u jediné pacientky se žilními komplikacemi byla dokonce 40 měsíců. Tento rozdíl přisuzujeme nehomogenitě sledování v rámci souboru a nepřikládáme mu výrazný význam. Průměrná doba objevení nežádoucích účinků, které vedly k nutnosti změny terapie tamoxifenem, byla ve skupině s gynekologickými nežádoucími účinky 29 měsíců (rozmezí 6 – 54 měsíců), a u jediné pacientky s hlubokou žilní trombózou, navíc zatíženou predispozicí na trombembolické komplikace, to bylo 11 měsíců.

V podsouboru postmenopauzálních pacientek byly z hodnocených 187 pacientek sledované nežádoucí účinky zaznamenány u 70 (37%) pacientek, z toho bylo 46 pacientek s gynekologickými NÚ, 23 pacientek mělo žilní komplikace a u jedné pacientky byly zaznamenány oba druhy komplikací. Věkem v době diagnózy se soubory celého postmenopauzálního podsouboru, podsouboru pacientek bez NÚ a pacientek s NU opět výrazně neliší. Věkový medián je relativně konzistentní 57 – 61 let pro všechny podsoubory. Délka sledování byla u postmenopauzálních pacientek, na rozdíl od premenopauzálních pacientek, v podstatě srovnatelná v celém souboru a v podsouboru bez NU a se žilními komplikacemi (91 a 88 měsíců, respektive 85 měsíců), pouze mírně kratší sledování bylo u pacientek s gynekologickými komplikacemi (71 měsíců). Průměrná doba do objevení nežádoucích účinků vedoucích k nutnosti změny terapie tamoxifenem byla ve skupině s gynekologickými nežádoucími účinky 23 měsíců (rozmezí 6-78 měsíců), u pacientek se žilními komplikacemi to bylo 30 měsíců (rozmezí 8-60 měsíců) a u jediné pacientky se synchronním výskytem obou druhů komplikací byla terapie TMX na základě NÚ zaměněna 16 měsíců od zahájení.

Souhrnná tabulka (**Tab. 12**) přináší přehled základní demografie pacientek s výskytem sledovaných druhů NÚ a bez výskytu NÚ v celém sledovaném souboru a obou podsouborech

Tab. 12: Základní demografie patientek s výskytem nežádoucích účinků

	Celý soubor	Bez NÚ	NÚ gyn	NÚ žilní	NÚ obojí
CELÝ SLEDOVANÝ SOUBOR					
Věk v době Dg median (rozmezí) [roky]	50 (26 – 80)	48 (30 – 77)	52 (38 – 80)	58 (50 – 80)	58
Průměrná délka sledování (rozmezí) [měsíce]	74 (6 – 244)	78 (9 – 224)	78 (16 – 198)	85 (40 – 156)	60
Délka užívání TMX (rozmezí) [měsíce]	43 (8-84)	60 (9-88)	21 (6 – 78)	25 (8 – 60)	16
PREMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
Věk v době Dg median (rozmezí) [roky]	44 (26-52)	42 (30-51)	44 (39 – 51)	44	-
Průměrná délka sledování (rozmezí) [měsíce]	56 (8-198)	66 (9-151)	90 (16 – 198)	40	-
Délka užívání TMX (rozmezí) [měsíce]	43 (8-84)	60 (9-88)	29 (6 – 54)	11	-
POSTMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
Věk v době Dg median (rozmezí) [roky]	57 (38 – 80)	57 (46 – 77)	61 (38 – 80)	60 (50 – 80)	58
Průměrná délka sledování (rozmezí) [měsíce]	91 (6 – 244)	88 (9 – 224)	71 (45 – 173)	85 (47 – 156)	60
Délka užívání TMX (rozmezí) [měsíce]	43 (8-84)	60 (9-88)	23 (6 – 78)	30 (8 – 60)	16

Zdroj: vlastní zpracování

Regresní analýza závislosti doby NÚ na věku a délce sledování potvrdila závislost objevení všech NÚ na délce sledování ($p = 0.001$, $F = 11.6949$) a určitou tendenci k statistické závislosti vzniku NÚ na věku patientek v době diagnózy ($p = 0.102$, $F = 2.7303$), ale bez statistické signifikance. Dále byla provedená regresní analýza objasňující vztah mezi dobou do objevení všech NÚ a expresí ER (v tumoru!), která nepotvrdila významnou závislost ($p = 0.782$, $F\text{-ratio} = 0.07724$).

4.3.2 Vliv ko-medikace na výskyt nežádoucích účinků

Ko-medikaci inhibitory CYP2D6 mělo z celkového počtu 56 pacientek s gynekologickými NÚ v celém souboru 7 pacientek, nejčastěji byl užíván citalopram, fluoxetin a méně sertralin. Ko-medikaci induktory mělo rovněž 7 pacientek, nejčastěji tramadol a metoprolol. U pacientek se žilními komplikacemi nebyla, paradoxně, zaznamenána žádná ko-medikace inhibitory CYP2D6, pouze induktory a to u 5 postmenopauzálních a 3 premenopauzálních pacientek. Přehledně jsou počty a procentuální zastoupení pacientek bez k-medikace ovlivňující CYP2D6 a s ko-medikací inhibitory a induktory vyjádřeny v následující tabulce (**Tab.13**). V celému sledovanému souboru a v obou podsouborech byl u pacientek s gynekologickými i žilními komplikacemi zachycen relativně vyšší výskyt ko-medikace induktory/substráty CYP2D6 (zatímco průměrný výskyt v neselektovaném souboru byl pro ko-medikaci induktory 4 -7 %, pacientky s NÚ užívaly induktory v 11 – 20 %). S ohledem na velmi malé zastoupení pacientek s udávanou ko-medikací, je velmi obtížné hodnotit trendy a tendence v časech do nástupu NÚ (TTE). Zatím můžeme pouze konstatovat, že doba do objevení NÚ se u obou skupin léků ovlivňujících funkci CYP2D6 pohybuje nejčastěji mezi 9 až 23 měsíci po nasazení TMX.

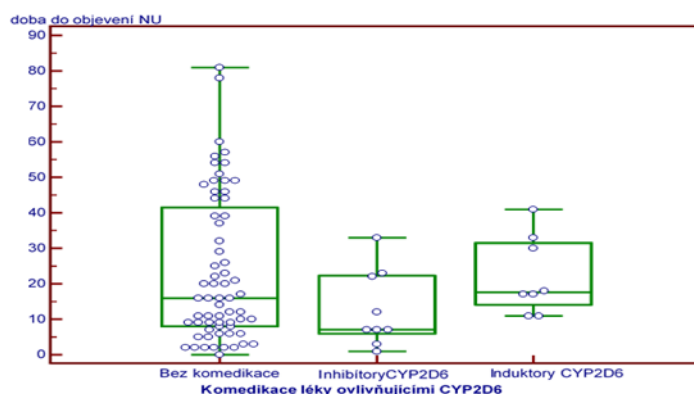
Tab. 13: Ko-medikace induktory a inhibitory CYP2D6 u pacientek s nežádoucími účinky

KOMEDIKACE	Celý soubor	Bez NÚ	NÚ gyn	NÚ žilní	NÚ obojí
CELÝ SLEDOVANÝ SOUBOR					
<u>BEZ KOMEDIKACE</u>	226 (87 %)	160 (89 %)	42 (76 %)	21 (88 %)	1
					0
<u>KOM. INHIBITORY</u>	24 (9 %)	17 (11%)	7 (12 %)	0	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			23 (11 – 41)	0	0
<u>KOM. INDUKTORY</u>	10 (4 %)	0	7 (12 %)	3 (12 %)	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			9 (3 – 23)	23 (12 – 33)	0

PREMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
<u>BEZ KOMEDIKACE</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	56 (76 %)	48 (80 %)	8 (80 %) 0	1 0	0 0
<u>KOM. INHIBITORY</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	12 (17 %)	12 (20 %)	0 0	0 0	0 0
<u>KOM. INDUKTORY</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	2 (7 %)	0	2 (20%) 4 (1 – 7)	0 0	0 0
POSTMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
<u>BEZ KOMEDIKACE</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	170 (90 %)	115 (96 %)	34 (74 %)	20 (87 %)	1 0
<u>KOM. INHIBITORY</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	12 (6 %)	5 (4 %)	7 (15 %) 23 (11 – 41)	0 0	0 0
<u>KOM. INDUKTORY</u> Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	8 (4 %)	0 0	5 (11 %) 10 (3 – 22)	3 (13 %) 23 (12 – 33)	0 0

Zdroj: vlastní zpracování

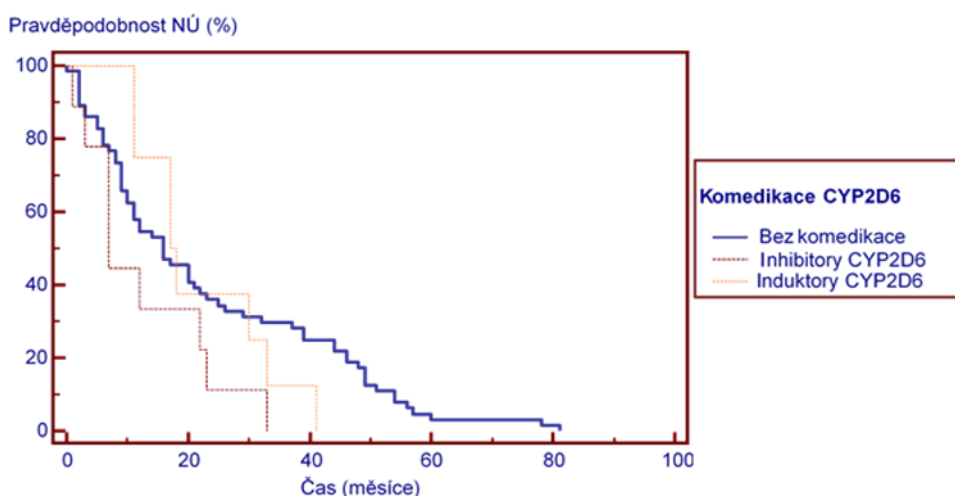
Vliv ko-medikace inhibitory resp. induktory CYP2D6 na dobu do objevení neselektovaných NÚ (TTE) se ve vytvořeném krabicovém grafu (**Obr. 31**) nejeví významný, a statistická analýza tohoto vlivu nebyla potvrzená ani provedeným Kruskal-Walisovým testem ($p = 0.2568$).



Obr. 31: Krabicový graf vlivu ko-medikace induktory / inhibitory CYP2D6 na TTE

Zdroj: vlastní zpracování

V Kaplan-Meierově analýze je naznačená separace ramene pacientek bez NÚ směrem k prodloužení TTE, zatímco křivky pro pacientky s inhibitory a induktory ovlivňující funkci CYP2D6 jeví trend ke zkrácení doby do objevení NÚ (**Obr. 32**). Příslušná statistická analýza, ale nepotvrdila významnost vlivu ko-medikace na TTE, byl pozorován pouze určitý statistický trend k prodloužení TTE u pacientek bez sledované ko-medikace ($p = 0.1714$, $\chi^2 = 3.5275$).



Obr. 32: Kaplan-Meierova křivka vlivu ko-medikace na dobu do objevení NÚ (TTE)

Zdroj: vlastní zpracování

Dalším krokem bylo provedení rozboru vlivu sledované ko-medikace odděleně pro oba druhy sledovaných NÚ. Srovnávací analýzy (F a T-test equality) neprokázaly významný rozdíl mezi vlivem ko-medikace a výskytem obou typů (F-test: $p = 0.290$, T-test: $p = 0.3232$). Souhrnně lze tedy konstatovat, že při analýzách vlivu ko-medikace

ovlivňující funkci CYP2D6 nebyla prokázána žádná statisticky významná korelace mezi sledovanou ko-medikací a výskytem nebo nástupem NÚ při terapii tamoxifenem.

4.3.3 Vliv polymorfismů CYP2D6 na výskyt nežádoucích účinků

Přehled zastoupení jednotlivých fenotypů CYP2D6 v celém zkoumaném souboru a obou podsouborech, s rozdělením na skupiny celého souboru, podsouboru bez NÚ, s gynekologickými, žilními event. obojími NÚ, je v tabulce (**Tab. 14**). U každého typu komplikace jsou pro jednotlivé polymorfismy uvedeny průměrná doba do objevení NÚ a rozpětí. Z tabulky je zřejmé, že rozdělení jednotlivých polymorfismů v celém zkoumaném souboru i podsouborech premenopauzálních a postmenopauzálních pacientek respektuje Hardy – Weinbergovu rovnováhu rozdělení polymorfismů v české populaci, se zastoupením EM 47 %, IM 42 – 43 %, PM 8 – 10 % a UM 2 %. V celém sledovaném souboru byl u pacientek s gynekologickými i venózními komplikacemi pozorován nižší relativní výskyt PM fenotypů (5 %) a u pacientek se žilními komplikacemi bylo zaznamenáno relativní zvýšení IM fenotypu (60 %), a naopak, snížení EM (cca 30 %). Tyto odchylky u pacientek nemají žádný logický sled a ani v době do objevení NÚ se nedá vysledovat žádný jasný vývoj, z kterého bychom usuzovali jasný vliv CYP2D6 polymorfismů na vznik a dobu do objevení některého ze sledovaných NÚ. Obdobné zastoupení jednotlivých polymorfismů CYP2D6 v jednotlivých podskupinách bylo zaznamenáno i v postmenopauzálním podsouboru. Premenopauzální podsoubor je, s ohledem na malé zastoupení pacientek při rozvrstvení na fenotypy CYP2D6, nehodnotitelné. Následná srovnávací statistická analýza Long-rang testem nepotvrdila, při srovnání pacientek s a bez NÚ, statistickou významnost v zastoupení některého CYP2D6 fenotypu ($p = 0.1263$, $\chi^2 = 7.187$, $CC = 0.346$).

Tab. 14: Predikované fenotypy CYP2D6 u pacientek s nežádoucími účinky

CYP2D6	Celý soubor	Bez NÚ	NÚ gyn	NÚ žilní	NÚ obojí
CELÝ SLEDOVANÝ SOUBOR					
EM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	125 (47%)	87 (47 %)	29 (53 %) 23 (2 – 78)	9 (29 %) 24 (3 – 81)	0 0
IM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	112 (42 %)	76 (41 %)	22 (40 %) 18 (3 – 49)	13 (61 %) 25 (2 – 60)	1 16
PM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	23 (9 %)	19 (10 %)	3 (5%) 18 (2 – 49)	1 (5 %) 44	0 0
UM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	5 (2 %)	2 (1 %)	2 (2 %) 8 (5 – 11)	1 (5%) 46	0 0
PREMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
EM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	36 (48 %)	30 (44 %)	6 (60 %) 30 (2 – 57)	1 11	0 0
IM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	32 (42 %)	28 (42 %)	4 (40 %) 24 (7 – 49)	0 0	0 0
PM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	9 (9 %)	9 (13 %)	0 0	0 0	0 0
UM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	1 (1 %)	1 (1 %)	0 0	0 0	0 0
POSTMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
EM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	89 (48 %)	58 (49%)	23 (50 %) 23 (7- 78)	8 (36 %) 28 (3 – 81)	0 0
IM	80 (43 %)	48 (41 %)	18 (40 %)	13 (56 %)	1

Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			18 (2 – 48)	25 (2 – 60)	16
PM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	14 (7 %)	10 (8 %)	3 (6 %) 18 (2 – 49)	1 (4 %) 44	0 0
UM Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	4 (2 %) 0	1 (2 %) 0	2 (4 %) 8 (5 – 11)	1 (4%) 46	0 0

Zdroj: vlastní zpracování

Následně jsme zkoumali závislost doby do objevení neselektovaných NÚ (TTE) na polymorfismu *CYP2D6* dvěma statistickými metodami, které souhlasně tuto hypotézu nepotvrdily (Kaplan-Meireova analýza: $p = 0.8118$, $\chi^2 = 1.5834$ a Kruskal-Walisova analýza: $p = 0.8962$).

Dále byla provedena analýza závislosti doby do objevení NÚ (TTE) na polymorfismu *CYP2D6* odděleně pro skupinu pacientek s gynekologickými komplikacemi a se žilními komplikacemi. Ve skupině s gynekologickými komplikacemi bylo pozorováno zkrácení doby do objevení NÚ (TTE) u heterozygotek IM, což by nasvědčovalo rychlejšímu nástupu NÚ v případě snížené schopnosti přeměny tamoxifenu na jeho aktivní metabolity, kterou ale provedené statistické testy nepotvrdili ($p = 0.415$). Obdobné analýzy (ANNOVA) pro pacientky se žilními komplikacemi rovněž, i přes určité naznačené trendy popsané výše, nepotvrdily závislost TTE na polymorfismu *CYP2D6* ($p = 0.66$).

4.3.4 Vliv polymorfismů *ABCB1* genu na výskyt nežádoucích účinků

4.3.4.1 Analýza polymorfismu *rs2032582* (v *exonu 21*)

Relativně malý soubor pacientek s NÚ by se dalším dělením na NÚ gynekologické a žilní a při analýzách vícero variant *exonu 21* roztříštil na velmi nekoherentní malé podsoubory. Proto jsme přistoupili k hodnocení polymorfismu *exonu 21* se sjednodušením, při kterém jsme sdružili možné varianty polymorfismů, a tím rozlišovali pouze tři hodnocené varianty – 1.) homozygotky pro wt alelu (GG polymorfismus, wt / wt, dále označení wt – homozygotky), 2.) heterozygotky s jednou variantní alelou (T nebo A, wt / vt, dále označené jako heterozygotky), a 3.) variantní homozygotky (TT nebo AA,

vt/vt, dále označené jako vt – heterozygotky). Jejich přehledné zastoupení je shrnuto v **Tab. 15**. Relativní zastoupení jednotlivých sloučených fenotypů v celém sledovaném souboru bylo: wt-homozygotky – 29 %, heterozygotky – 54 % a vt-homozygotky – 17 %, což koreluje s Hardy-Weinbergovou rovnováhou i, s přihlédnutím na provedené sloučení variantních alel, s předtím udávaným zastoupením jednotlivých fenotypů v naší populaci. V celém sledovaném souboru bylo pozorováno u obou typů NÚ relativně vyšší zastoupení wt-homozygotek (38 % u gynekologických respektive 33 % u žilních NÚ), dále nižší zastoupení heterozygotů (40 % respektive 33 %) a opět vyšší výskyt vt-homozygotů (22 % respektive 33 %). Obdobně jako u polymorfismů *CYP2D6* tedy nebyl shledán žádný logický vývoj směrem k vyššímu, respektive nižšímu zastoupení polymorfismů *exonu 21* u žádného druhu komplikací. Rovněž časy do objevení NÚ nejevily žádnou statistickou závislost. Obdobná situace byla zaznamenána i v obou podsouborech: v premenopauzálním podsouboru byly hodnotitelné, s ohledem na malé počty patientek s NÚ, pouze gynekologické komplikace, kde byl zaznamenán značně vyšší výskyt wt-homozygotek (63 %), ale i vt-homozygotek (35%), za relativního snížení zastoupení heterozygotek. V postmenopauzálním souboru bylo pozorováno vyšší zastoupení obou homozygotů (wt – 40% a vt – 30 %) pouze v řadách patientek se žilními NÚ.

Tab. 15: Polymorfismy rs2032582 *ABCB1* u patientek s nežádoucími účinky

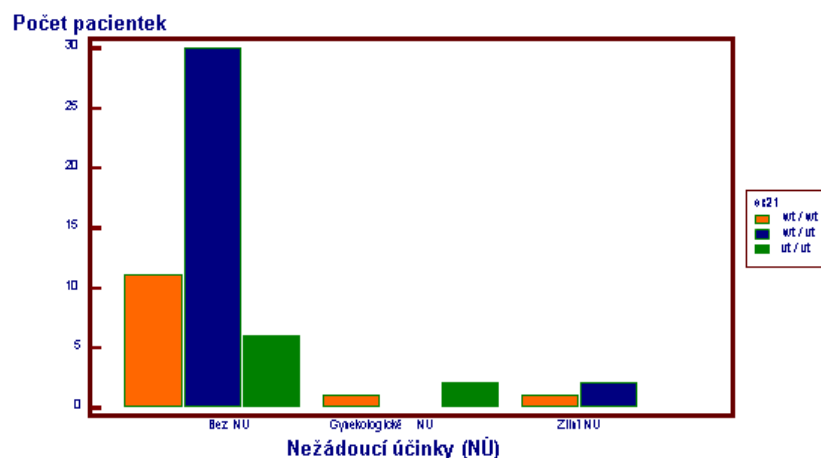
	Celý soubor	Bez NÚ	NÚ gyn	NÚ žilní	NÚ obojí
CELÝ SLEDOVANÝ SOUBOR					
wt / wt	73 (29 %)	45 (26 %)	20 (38 %)	8 (33.3 %)	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			15 (1 – 52)	25 (8 – 51)	0
wt / vt	136 (54 %)	107 (62 %)	21 (40 %)	8 (33.3 %)	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			24 (3 – 78)	21 (2 – 46)	0
vt / vt	41 (17 %)	20 (12 %)	12 (22 %)	8 (33.3 %)	1
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			28 (7 – 57)	32 (3 – 81)	16
PREMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
wt / wt	27 (36 %)	22 (33 %)	5 (63 %)	1	0
Průměrná doba objevení			25 (1 – 52)	11	0

NÚ (rozmezí) [měsíce]					
wt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	37 (49 %)	36 (53 %)	1 (12 %) 7	0 0	0 0
vt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	12 (16 %) -	9 (14 %) -	3 (35 %) 45 (23 – 57)	0 0	0 0
POSTMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
wt / wt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	46 (26 %)	24 (23 %)	15 (26 %) 12 (1 – 49)	7 (40 %) 26 (8 – 51)	0 0
wt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	99 (58 %)	71 (65 %)	20 (48 %) 25 (3 – 78)	8 (30 %) 21 (2 – 46)	0 0
vt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	29 (16 %)	11 (12 %)	9 (26 %) 22 (7 – 49)	8 (30 %) 32 (3 – 81)	1 16

Zdroj: vlastní zpracování

Nesourodé trendy zaznamenané ve všech sledovaných podsouborech u obou druhů komplikací jsme se snažili objektivizovat následnými statistickými metodami. Nejdříve jsme srovnávali zastoupení jednotlivých nesloučených polymorfismů mezi pacientkami bez NÚ a pacientkami s NÚ, a to odděleně pro oba typy NÚ. Srovnávací statistická analýza Long – rang testem překvapivě prokázala statisticky významné rozdíly v zastoupení polymorfismů s variantní alelou mezi pacientkami s výskytem neselektovaných NÚ ($p = 0.0026$, $\chi^2 = 26.996$, $CC = 0.581$). S ohledem na malé počty pacientek v minoritních polymorfismech, které zkreslují statistickou analýzu, jsme v následném kroku provedli obdobnou analýzu po sloučení jednotlivých skupin polymorfismů *exonu 21* do výše popsaných třech základních skupin (**Obr. 33**), a odpovídající statistická analýza sloučených skupin tentokrát nepotvrdila statistický vliv polymorfismů *exonu 21* na výskyt nežádoucích účinků, pouze zřetelný trend k statistické významnosti ($p = 0.0899$, $\chi^2 = 8.045$, $CC = 0.363$). Domníváme se, že prokázána statistická signifikance nesloučených polymorfismů je může být následek chyby malých čísel

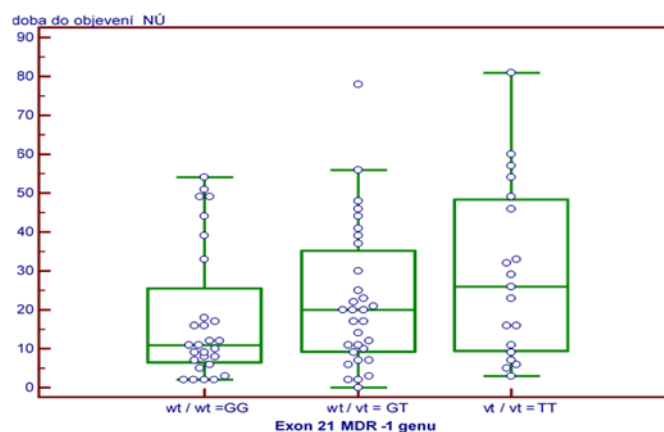
po roztržštění skupin na vícero malých skupin, ale jasný statistický trend po sloučení, naznačuje určitý význam polymorfismů *exonu 21* na vývoji NÚ.



Obr. 33: Sloupkový graf srovnávající výskyt jednotlivých polymorfismů *exonu 21* v souborech pacientek bez NÚ s pacientkami s gynekologickými a žilními komplikacemi

Zdroj: vlastní zpracování

Dále jsme zkoumali vliv polymorfismů *exonu 21* na dobu do objevení NÚ. Z krabicového grafu, přehledně znázorňujícího TTE pro sloučené polymorfismy *exonu 21* (Obr. 34), je zřejmé postupné prodlužování mediánů TTE s přibývajícím zastoupením variantních alel (tj. od wt- homozygotek, přes heterozygotky, směrem k vt-homozygotkám). Následná Kruskal-Wallisova analýza prokázala opět pouze trend ke statistické významnosti ($p = 0.1361$).

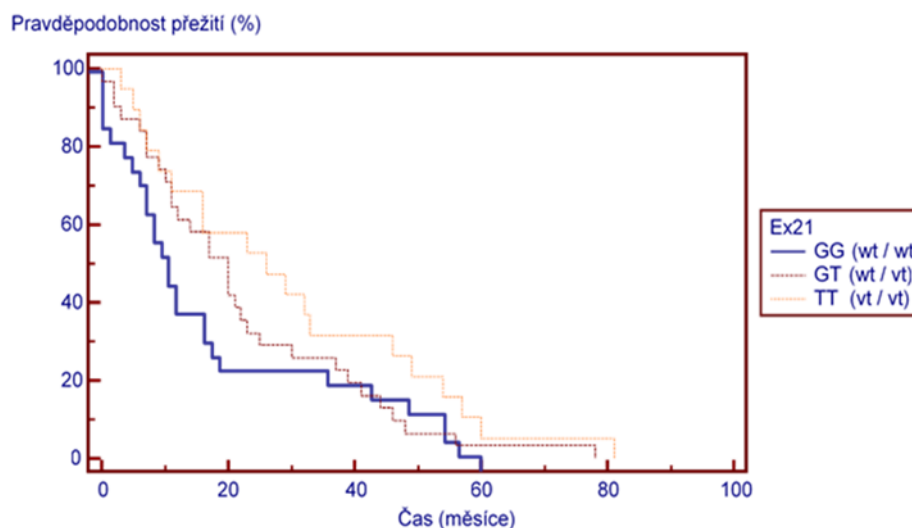


Obr. 34: Krabicový graf vlivu polymorfismů *exonu21* na dobu objevení NÚ (TTE)

Zdroj: vlastní zpracování

Pro bližší ověření vztahu doby do objevení NÚ(TTE) a jednotlivých polymorfismů *exonu21* byla sestavena Kaplan-Meirova křivka (Obr. 35), z které je zřejmé, že po úvodní

naznačené separaci ramene pro wt-homozygotky (*GG*, wt/wt) a následném splynutí po cca 40 měsících, není mezi rameny pro jednotlivé polymorfismy naznačený žádný zřejmý trend. Statistická analýza rovněž nepotvrdila statistickou významnost vlivu polymorfismu *exonu 21* do objevení neselektovaných NÚ, ale opět byl pozorován určitý trend ke zkrácení nástupu NÚ u wt-homozygotek (*GG*) ($p = 0.1300$, $\chi^2 = 4.0804$).



Obr. 35: Kaplan Meierova křivka vlivu polymorfismu *exonu 21* na rychlost nástupu NÚ (TTE)

Zdroj: vlastní zpracování

POZN: pro všechny obrázky polymorfismu *exonu 21* platí: 1.) wt/wt- homozygotky pro wt alelu (*GG* polymorfismus), 2.) wt/vt – heterozygotky s jednou variantní alelou (*T* nebo *A*) a 3.) vt/vt- homozygotky pro některou z variantních alel (*TT* nebo *AA*).

4.3.4.2 Analýza polymorfismu *rs1045624* (v *exonu 26*)

Přehled počtů a procentuálního zastoupení vyvariant polymorfismu *exonu 26* v celém souboru a obou sledovaných podsouborech, rozdělený opět na pacientky bez NÚ, pacientky s gynekologickými a žilními komplikacemi, respektive obojími komplikacemi, při terapii TMX, je přehledně znázorněn v následující tabulce (**Tab. 16**). Rozložení variant *exonu 26* respektuje jejich zastoupení v české populaci i Hardy-Weinbergovou rovnováhu, i když byla pozorována lehce vyšší variabilita mezi sledovanými odsoubory: wt-homozygotky 31 – 38 %, s lehce nižším výskytem v podsouboru premenopauzálních pacientek 21 – 24 %, zatímco heterozygotky zastoupené 48 – 55 %, s naopak vyšším procentem v premenopauzálním podsouboru 58 – 62 %. Výskyt vt-homozygotek byl v celém souboru i obou podsouborech relativně konzistentní – 12 – 21 %. Při zaměření se na zastoupení polymorfismu ve skupině pacientek s gynekologickými NÚ nepozorujeme

žádnou převahu, respektive významné snížení jednotlivých variant oproti celému souboru. Co se týče časů nástupu gynekologických nežádoucích účinků (TTE), můžeme pozorovat určité prodloužení nástupu gynekologických obtíží u nosiček variantních alel, ale opět s významnou variabilitou. U pacientek se žilními komplikacemi, pozorujeme snížené relativní zastoupení wt-homozygotek proti celému souboru ve všech třech sledovaných souborech (17 – 21% respektive 29 – 31%). Heterozygotky byly relativně méně zastoupené (42 – 44 %, respektive 51 – 58 %), což je následováno vyšším výskytem vt- homozygotek (37 – 39 % proti 18 – 21 % v celém souboru). V podsouboru premenopauzálních pacientek byla jediná pacientka se žilními komplikacemi, navíc nosička Leidenské predispozice pro žilní komplikace, u které byl zaznamenán wt genotyp pro *exon 26* a nástup žilních komplikací byl 11 měsíců. U obou dalších analyzovaných souborů byl zaznamenán jasný, i když ne výrazný, trend v prodlužování doby do objevení žilních komplikací od wt-homozygotek po vt- homozygotky (wt- homozygotky 14-15 měsíců, heterozygotky 28 měsíců a variantní homozygotky 32 měsíců). Jediná pacientka, u které byly zaznamenány oba druhy NÚ byla rovněž nosičkou 2 variantních alel s nástupem obou NÚ po 11 měsících. Z výše uvedeného vyplývá, že prvně byl jasně naznačený trend k prodlužování nástupu NÚ s výskytem variantních alel, i když pouze pro žilní komplikace.

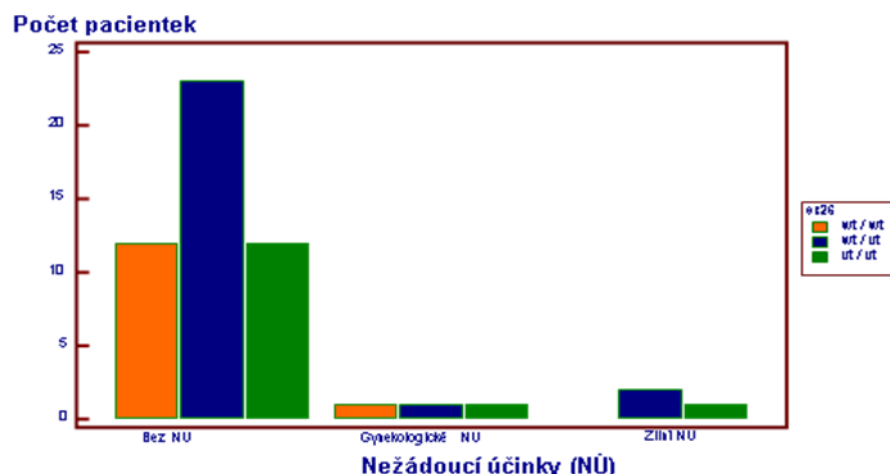
Tab. 16: Polymorfismy *rs1045624 ABCB1* genu u pacientek s nežádoucími účinky

MRD1gen exon26	Celý soubor	Bez NÚ	NÚ gyn	NÚ žilní	NÚ obojí
CELÝ SLEDOVANÝ SOUBOR					
wt / wt	73 (29 %)	54 (32 %)	14 (26 %)	5 (21 %)	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			11 (1 – 49)	14 (8 – 23)	0
wt / vt	127 (51 %)	94 (55 %)	23 (43 %)	10 (42 %)	0
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			26 (2 -78)	28 (2 – 51)	0
vt / vt	51 (20 %)	24 (13 %)	17 (31 %)	9 (37 %)	1
Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]			24 (7 – 57)	32 (2 – 81)	16

PREMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
wt / wt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	18 (24 %)	14 (21 %)	3 (33 %) 24 (7 – 49)	1 11	0 0
wt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	44 (58 %)	41 (62 %)	3 (33 %) 23 (6 – 54)	0 0	0 0
vt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	14 (18 %)	11 (17 %)	3 (33 %) 52 (23 – 57)	0 0	0 0
POSTMENOPAUZÁLNÍ SOUBOR					
wt / wt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	55 (31 %)	40 (38 %)	11 (25 %) 7 (1 – 17)	4 (17 %) 15 (8 – 23)	0 0
wt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	83 (48 %)	53 (50 %)	20 (45 %) 27 (2 – 78)	10 (44 %) 28 (2 – 51)	0 0
vt / vt Průměrná doba objevení NÚ (rozmezí) [měsíce]	37 (21 %)	13 (12 %)	14 (30 %) 19 (7 – 41)	9 (39 %) 32 (2 – 81)	1 16

Zdroj: vlastní zpracování

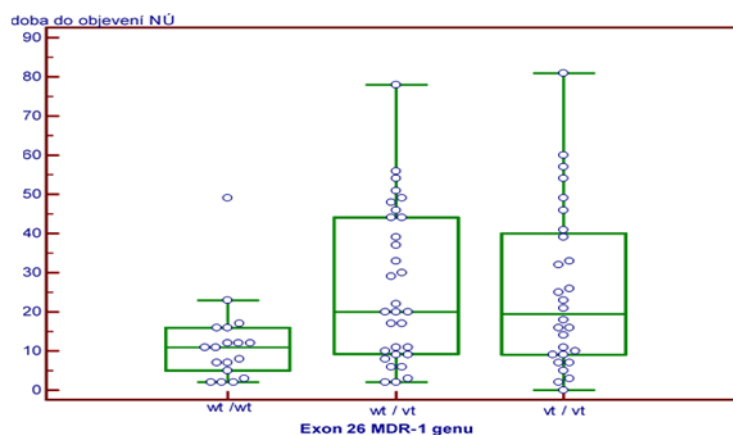
Pro ozřejmení výše naznačených trendů k vyššímu zastoupení variantních alel u pacientek s NÚ, jsme v úvodu statistických analýz sestavili sloupcový graf (**Obr. 36**) se znázorněním zastoupení polymorfismu *exonu 26* mezi pacientkami bez NÚ, s gynekologickými a žilními NÚ. Následná srovnávací analýza Long-rang testem nepotvrdila vyšší výskyt některé z variant ve sledovaných skupinách ($p = 0.8591$, $\chi^2 = 1.314$, $CC = 0.156$).



Obr. 36: Sloupkový graf srovnávající výskyt jednotlivých polymorfismů *exonu 26* mezi pacientkami bez NÚ, s gynekologickými a žilními komplikacemi

Zdroj: vlastní zpracování

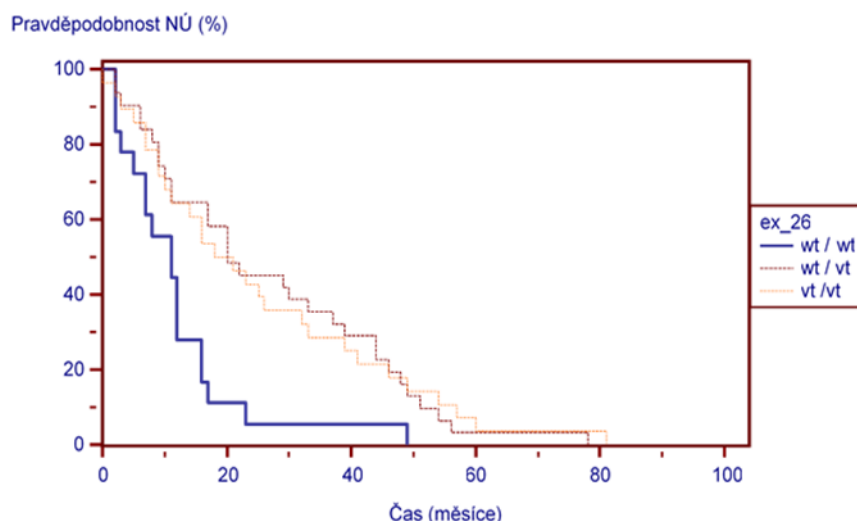
Dále jsme, v souladu s analýzami předešlých polymorfismů, analyzovali vliv polymorfismu *exonu 26* na dobu do objevení NÚ (TTE). Krabicový graf, zobrazující vliv jednotlivých variant na TTE (**Obr. 37**), naznačuje srovnatelný medián do objevení NÚ u žen s minimálně jednou variantní alelou, se zřejmým zkrácením mediánu objevení NÚ u nosiček 2 funkčních alel (wt – homozygotek). Kruska-Wallisova analýza potvrdila statistickou významnost vlivu polymorfismu *exonu 26* na dobu vzniku NÚ ($p = 0.0243$).



Obr. 37: Krabicový graf vlivu polymorfismů *exonu 26* na dobu do vzniku NÚ (TTE)

Zdroj: vlastní zpracování

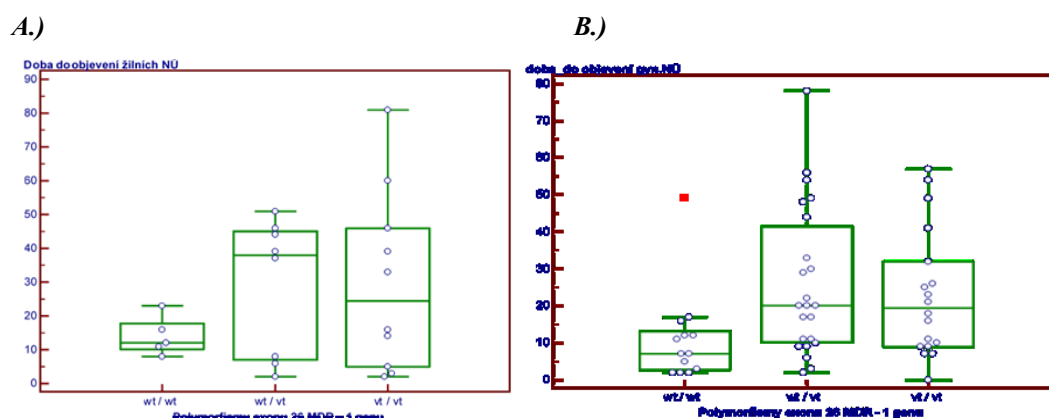
Pro potvrzení tohoto vztahu jsme použili Kaplan-Meierovu analýzu (**Obr. 38**). Z grafu je zřejmá separace ramene pro wt-homozygotky se zkrácením TTE. Statistická analýza potvrdila významnost vlivu polymorfismu *exonu 26* na dobu do objevení NÚ, s významným zkrácením TTE u wt-homozygotek ($p = 0.016$, $\chi^2 = 9.0960$).



Obr. 38: Kaplan – Meierova analýza vlivu polymorfismů *exonu 26* na TTE

Zdroj: vlastní zpracování

Následně jsme analyzovali tento vztah odděleně pro gynekologické a žilní NÚ (**Obr. 40 A a B**). Z krabicového grafu (**A.**) pro skupinu s gynekologickými NÚ je zřejmé zkrácení mediánu objevení NÚ u wt- homozygotek, ve srovnání s mediánem TTE u nosiček minimálně jedné variantní alely. Statistická analýza prokázala významnost tohoto vztahu ($p = 0.0221$). Ve skupině žilních komplikací byl sestavený obdobný krabicový graf (**B.**), z kterého již není trend k prodloužení doby do objevení žilních komplikací u nosiček variantních alel zřejmý a následná statistická analýza tentokrát nepotvrdila statistickou signifikanci vlivu polymorfismu *exonu 26* na dobu do objevení NÚ u pacientek se žilními komplikacemi ($p = 0.290$).



Obr. 39: Krabicový graf vlivu polymorfismu *exonu 26* na dobu objevení pro A.) gynekologické a B.) žilní NÚ

Zdroj: vlastní zpracování

Souhrnně můžeme říct, že i přes určitý trend k vyššímu výskytu pacientek s variantními alelami v obou skupinách pacientek s komplikacemi při terapii TMX, nebyl statisticky prokázán vyšší výskyt variantních alel u pacientek s oběma NÚ souhrnně. Opakovaně se nám statisticky podařilo potvrdit zkrácení doby do objevení NÚ (TTE) u wt-homozygotek, ale pouze ve skupině gynekologických NÚ. Ve skupině žilních komplikací lze uvažovat pouze o trendu ke zkrácení doby do nástupu žilních komplikací u wt – homozygotek bez statistické významnosti. Zda se jedná pouze o bias při nižším výskytu žilních komplikací v sledovaném souboru (pouze 18 pacientek se žilními komplikacemi a 44 pacientek s gynekologickými komplikacemi), nebo je činnost efluxní pumpy P – gp regulována v žilní stěně jinak než v endometriu, zatím nevíme.

5 SOUHRN VÝSLEDKŮ A DISKUZE

Výhodou naší práce je jistě fakt, že stanovení genetických polymorfismů probíhalo ze vzorků krve, a tím nedošlo k možnému zkreslení zastoupení rozložení genotypů způsobené ztrátou heterozygosity, což byl, jak se nově ukazuje, významný problém starších studií, které analyzovaly polymorfismy z parafinových vzorků tkání pacientek (Goetz MP. et al., Johnson JA. et al., 2015). Tomuto nasvědčuje i relativně vyvážené rozložení zastoupení jednotlivých polymorfismů mezi oběma podsoubory, které koreluje s obdobným zastoupením zkoumaných polymorfismů v dalších publikacích (Zanger UM. et al., 2004, Kirschheiner J., 2008, Buzkova H. et al., 2008, Bijl MJ. et al., 2009, Čižmáriková M. et al., 2010, Taheri M. et al., 2010). Menší odchylky v zastoupení polymorfismů se objevují v podsouboru premenopauzálních pacientek a byly způsobeny relativně menší četností tohoto podsouboru. Samotné rozdělení pacientek dle stavu menopausy a oddělené stanovení obou podsouborů rovněž pokládáme za pozitivní přínos naší práce, protože v dosud publikovaných pracích se obecně hodnotily většinou pouze premenopauzální nebo postmenopauzální pacientky. Soubor postmenopauzálních pacientek je dvakrát četnější, protože diskuze benefitů tzv. „genotypem řízené hormonální terapie“ probíhají právě u postmenopauzálních pacientek. Počet pacientek souboru je srovnatelný s dosud publikovanými pracemi, a dokonce u stanovení polymorfismů *ABCB1* genu pro P-gp se řadí spíše ke studiím s větším souborem (Schroth W. et al., 2009, Kiyotani K. et al., 2010, Teh LK et al., 2012, Province MA. et al., 2013). Další nespornou výhodou je zahrnutí systematického sledování nežádoucích účinků při terapii tamoxifenem, které se sice v některých publikovaných pracích objevuje, ale nejsme si vědomi další publikace, která by v takovém rozsahu sledovala tak širokou paletu parametrů, které se podílejí na jednotlivých bodech individualizace terapie tamoxifenem.

Jistou nevýhodou je retrospektivní monocentrické vedení studie, což je ale nevýhoda většiny dosud publikovaných původních prací na toto téma (Goetz MA et al., 2005, Jin Y et al., 2005, Nowell SA et al., 2005, Schroth W et al., 2007, Newman WG et al., 2008, Abraham JE et al., 2010). Další nevýhodou je zahrnutí návalů pod gynekologické nežádoucí účinky. Při plánování projektu v roce 2008 jsme návaly při terapii tamoxifenem vnímali jako efekt související s hormonální změnou a našim hlavním záměrem bylo odlišit žilní komplikace terapie tamoxifenem od ostatních. Zpětně neodlišení vasomotorických NÚ (návalů neboli „hot-flush“) sice vnímáme jako určitou

nevýhodu, ale s ohledem na nedostatečný systematický výzkum vlivů sledovaných polymorfismů na vznik a výskyt nežádoucích účinků obecně, je i přes tento určitý deficit práce nesporným přínosem.

Pokud se krátce zaměříme na výsledky primárních analýz, nebyl v našem souboru zaznamenán statisticky významný rozdíl v délce užívání TMX mezi skupinou progredujících a neprogredujících pacientek, a lze konstatovat, že ačkoliv byly do sledování zařazovány jak již odléčené pacientky, tak pacientky při probíhající terapii, terapie tamoxifenem v našem souboru probíhala relativně konzistentně. Již ze základní tabulky bylo zřejmé, že v obou podsouborech byly většinově zastoupeny pacientky s vyšší expresí ER při relativně rovnoměrném zastoupení exprese PR. U obou podsouborů byla statisticky potvrzená vzájemná lineární závislost míry exprese PR a ER v tumoru (postmenopauzální podsoubor: $p = 0,001$, premenopauzální podsoubor: $p = 0,0033$). Exprese ER a PR je prokázaným prognostickým parametrem a exprese ER, navíc, i významným prediktivním parametrem v hormonální terapii karcinomu prsu. Tato vzájemná lineární závislost exprese obou hormonálních receptorů nebyla nikde v námi dostupné literatuře diskutována. Tento závěr si vysvětlujeme jako výsledek stejných regulačních hormonálních mechanismů, které centrálně řídí hormonální produkci v celém organismu. Při srovnání závislosti míry exprese ER a PR a TTE ve skupině progredujících pacientek byla potvrzená jasná statistická signifikance ($p = 0.023$), což potvrzuje obecně uznávanou roli ER jako prediktoru efektivity hormonální terapie (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005*). Analýzami vlivu iniciálního stadia nemoci na TTE jsme prokázali statistickou signifikanci zkrácení TTE v T2 a vyšších stádiích nemoci pouze v postmenopauzálním souboru ($p = 0.013$), který měl, s ohledem na svojí četnost, rovnoměrnější zastoupení jednotlivých stádií napříč souborem. Iniciální stadium nemoci je rovněž uznávaným nezávislým prognostickým faktorem pro míru návratu nemoci (RR – recurrence rate) i celkové přežití bez ohledu na stav menopauzy (*Rosen PP. et al, 1989, Neville AM. et al, 1992*).

Vliv sledované ko-medikace inhibitory respektive induktory CYP2D6, jako možného zdroje iatrogenního ovlivnění funkce CYP2D6 a následné snížení účinnosti terapie tamoxifenem neprokázal v našich analýzách žádný statistický význam. Byl zaznamenán pouze určitý statistický trend ke zkrácení TTE při ko-medikaci silnými inhibitory CYP2D6 (např. paroxetin, fluoxetin, citalopram) užívané synchronně s terapií tamoxifenem (premenopauzální: $p = 0.197$, postmenopauzální: $p = 0.357$, celý

soubor: $p = 0.1802$), což potvrdily i následné Coxovy analýzy. Naše studie tedy podporuje výsledky řady tzv. „negativních studií“ (Nowell SA. et al., 2005, Wegman P. et al., 2007, Dezentje VO et al., 2009, Abraham JF. et al., 2010, Thompson AM. et al., 2011, Zhang X. et al., 2015), respektive závěry Croin-Fentonovy metaanalýzy z roku 2014, která prokázala nenulový, ale malý vliv pro PM polymorfismy *CYP2D6* a rovněž velmi malý vliv ko-medikace SSRI inhibitorů *CYP2D6* užívaných konkomitantně s tamoxifenem (Cronin-Fenton DP et al, 2014).

Polymorfismy *CYP2D6*, stejně jako ko-medikace, neprokázaly v našem sledování žádný statisticky významný vliv na efekt terapie tamoxifenem. Již úvodní přehledová tabulka sice naznačovala vyšší relativní zastoupení variantních fenotypů (IM a PM) mezi progredujícími pacientkami, ale následná Kaplan-Meierova analýza neprokázala významné zkrácení TTE pro variantní alely, což vycházelo konzistentně pro oba analyzované podsoubory (premenopauzální pacientky: $p = 0.1955$, postmenopauzální pacientky: $p = 0.2854$). Opakovaně byla z Coxových analýz prokázána jistá statistická tendence ke zkrácení TTE, ale pouze pro nosičky dvou variantních alel (PM) ($p = 0.0899$). Proč byl naznačen trend k snížení účinnosti terapie TMX v našem souboru pouze u PM fenotypu a nebyl zaznamenán i u nosiček 1 variantní alely (IM) nám relativně dostatečně zodpověděly dosud publikované studie. Dvě studie potvrdily snížení hladiny endoxifenu v korelaci s fenotypem *CYP2D6* a to až na polovinu u IM fenotypu a jednu čtvrtinu u PM fenotypu (hladina endoxifenu pro EM = 78 nM, IM = 43nM a PM = 20 nM) (Jin Y. et al, 2005, Lim YC. et al, 2007). Další publikované studie prokázaly rovněž snížený efekt terapie tamoxifenem ve smyslu signifikantního zkrácení času do návratu onemocnění (DFS resp RFS respektive TTR) pouze u polymorfismu PM (Goetz M. et al 2005, 2007 a 2008, Lim YC. et al 2008). Schrothova studie prokázala signifikantně vyšší míru návratu nemoci (RR) u genotypu PM ve srovnání s genotypem IM ($p = 0.02$) i ve srovnání se souhrnným fenotypem složeným s EM+IM ($p = 0.02$) (Schroth W. et al., 2009). Naši práci tedy řadíme k tzv. „negativním studiím“ (Nowell SA. et al., 2005, Wegman P. et al., 2007, Abraham JF. et al., 2010, Thompson AM. et al., 2011). Námi prokázán určitý trend ke statistické významnosti vlivu PM fenotypu *CYP2D6* na efektivitu terapie tamoxifenem, a i to obvykle ve spojení s dalšími zkoumanými polymorfismy, v podstatě korepondoval závěry několika publikací z posledních let, které prokazovaly, že i při negativitě vlivu samotných polymorfismů *CYP2D6* respektive genu pro P-gp, nalézáme při zkoumání jejich

součinnosti statisticky významný vliv na efektivitu terapie tamoxifenem (*Kiyotani K. et.al., 2010, Teh LK .et. al, 2012, Zafra-Ceres M. et.al.,2014*).

V případě polymorfismů *rs1045624 (exon 26)* a *rs2032582 (exon 21) ABCB1* genu jsme ředpokládali pozitivní vliv variantních alel na účinnost terapie tamoxifenem (snížení funkce efluxní pumpy P-gp s delším efektem tamoxifenu a jeho aktivních metabolitů v buňce). Několik publikovaných prací prokázalo, že tyto polymorfismy vedou ke snížení exprese P-gp. Dle některých autorů je exprese P-gp u wt-homozygotek pro *rs1045624* dvakrát vyšší než exprese P-gp u nosiček variantních fenotypů (*Hoffmayer S. et al., 2000, Sakaeda T. et al, 2003, Pechandová K et al., 2006, Vidová Z. et al., 2012*). Teh a jeho kolektiv prokázali, že ke zvýšené expresi P-gp dochází u karcinomu prsu i v souvislosti s podáním CHT, a rovněž prokázali, že u wt-homozygotek *exonu 26* dochází ke zkrácení doby do návratu onemocnění (TTR) a u kombinace 2 „nepříznivých fenotypů“, – IM pro CYP2D6 a wt-homozygota pro *exon 26* navíc i ke zvýšení míry návratu onemocnění (RR) a zkrácení mediánu času do návratu onemocnění (mRFS) ze 48 měsíců na 12 měsíců (*Teh LK et al., 2012*). Statisticky významný vliv variantních alel *exonu 26* na prodloužení TTE byl při našich analýzách prokázán pouze v premenopauzálním souboru ($p = 0.0012$, HR 0.69 (95% CI 0.21 – 2.31), ale nebyl potvrzen v postmenopauzálním ani celém souboru. V těchto byly zaznamenány pouze určité trendy ke statistické významnosti. Coxova analýza následně potvrdila statistickou významnost prognostického vlivu homozygota pro variantní alely ($p = 0.0005$, 95% CI 1.6620 – 6.1528), ale opět pouze pro premenopauzální soubor. Otázkou zůstává, proč by měl polymorfismus *exonu 26 ABCB1* genu být významný pouze u premenopauzálních pacientek. První úvahou byla stimulace P-gp adjuvantně aplikovanou chemoterapií, ale naše výsledky neprokazují signifikanci odděleně pro stádia T1 a u vyšších stádií onemocnění (T2 a více), u kterých lze před adjuvantní hormonální terapií očekávat indikaci adjuvantní chemoterapie, zvláště u premenopauzálních pacientek s pokročilejším stádiem nemoci (T1c a více). Takže tato úvaha jistě neobjasňuje náš výsledek. V celém sledovaném souboru byla analýzami potvrzena pouze určitá tendence polymorfismu *exonu 26* ke statistické signifikanci ($p=0.1882$), proto se spíš domníváme, že jasná statistická signifikance tohoto výsledku je spíš biasem při menším premenopauzálním souboru. S ohledem na opakovaně potvrzené signifikance a trendy ke signifikanci lze *exon 26* jistě počítat jako významného faktoru „komplexního genotypu“, který se podílí na variabilitě účinku terapie tamoxifenem.

Obdobné výsledky byly prokázány i pro polymorfismus *rs2032582 (exon 21)* *ABCB1* genu pro P-gp, u něhož se vyskytují dvě variantní alely (minoritní *A* a majoritní *T*). V průběhu statistických analýz byl v premenopauzálním souboru zaznamenán pouze určitý trend k statisticky významnému vlivu na TTE, zatímco v podsouboru postmenopauzálních pacientek byla prokázána jasná statistická závislost polymorfismu *exonu 21* na TTE ($p = 0.0357$, $\chi^2 = 11.9311$), která ale při selektovaných analýzách odděleně pro T1 a vyšší stadia prokázala statistickou signifikanci pouze pro méně zastoupené T2 a vyšší stadia ($p = 0.0187$). Coxovými analýzami byla potvrzená statistická signifikance pouze homozygota *AA* ($p = 0.0130$, $95\%CI = 1.8249 - 149.2781$) a významný trend k prodloužení TTE u nejčtenějších variantních homozygotů *TT* ($p = 0.0891$, $95\%CI = 0.1049 - 1.167$), které potvrzovaly náš předpoklad vyšší efektivity terapie v případě variantních polymorfismů. Dále byl zaznamenán trend ke zkrácení TTE při ko-medikaci inhibitory CYP2D6 ($p = 0.1802$, $95\%CI = 0.7916 - 3.5277$) a v případě nosiček variantních alel *CYP2D6* (PM: $p = 0.1011$ a IM: $p = 0.2906$). Naše výsledky jsou v souladu s publikovanými výsledky jiných autorů, kteří zkoumali vzájemnou součinnost polymorfismu *exonu 21 ABCB1* genu pro P-gp a *CYP2D6*, a kteří ve svých pracích prokázali, že v případě, že je pacientka nosičkou variantního fenotypu CYP2D6 (tj. IM nebo PM) a současně variantní alely *exonu 21*, nedochází u ní k poklesu plasmatické hladiny endoxifenu, jako je tomu pouze u variantních polymorfismů *CYP2D6*. Tyto práce rovněž prokázaly pokles rizika návratu nemoci (RFS) v přítomnosti variantních fenotypů *exonu21* (Kiyotani K. et al., 2010, Zafra-Ceres M. et al., 2014). Při hledání důvodu proč je signifikance prokázána pouze pro vyšší stadia můžeme uvažovat o stimulačním efektu chemoterapie aplikované před adjuvantní hormonální terapií, ale s ohledem na výsledky Coxových multifaktoriálních analýz, v kterých byla jasná statistická signifikance prokázána pouze pro minoritní *AA* variantní genotyp *exonu 21* (2 % populace), se jedná opět o možnou chybu malých čísel. Jako důležitější výsledek vnímáme výraznou tendenci k prodloužení TTE u nejčtenějších variantních homozygotů *TT*. Jisté tendence ke statistické významnosti více zkoumaných polymorfismů také naznačují významnější roli „komplexního genotypu“, což podporuje závěry výše zmíněných prací (Kiyotani K. et al., 2010, Teh LK. et al., 2012).

V našem souboru bylo zaznamenáno 81 pacientek (33 %), u kterých byly pozorovány neselektované nežádoucí účinky (NÚ) vedoucí k nutnosti změny hormonální terapie tamoxifenem. Z těchto byly u 23 % pacientek v průběhu terapie tamoxifenem

zaznamenány gynekologicko-vasomotorické NÚ a u 10 % pacientek žilní komplikace. Vyšší výskyt NÚ byl zaznamenán obecně v podsouboru postmenopausálních pacientek (37 %), s vyšším relativním výskytem žilních i gynekologicko-vasomotorických NÚ (12 % a 25 %). Nejčastější míra výskytu nežádoucích účinků, které vedly k ukončení terapie tamoxifenem, je obecně literárně udávána 20 – 30 %, což odpovídá výskytu neselektovaných NÚ v našem souboru (*Howell A et al., 2005, Visram H et al., 2010*). Nedávno publikovaná studie Baxtera udávala, že v průběhu terapie tamoxifenem trpí až 80 % pacientek návaly („hot flush“) (*Baxter SD. et al., 2014*). Tento významný rozdíl přisuzujeme retrospektivnímu vedení našeho a jiných výzkumu, kdy jsou údaje o NÚ získávány zpětně z dokumentace, a tedy lze předpokládat, že v rámci kontrol byly zaznamenávány pouze výraznější projevy návalů, které pacientky určitým způsobem limitovaly, a následně vedly ke změně terapie.

Zastoupení jednotlivých fenotypů CYP2D6 u pacientek s NÚ koresponduje s literárně udávaným rozložením genotypů v jiných studiích – cca 40 % EM a IM a cca 20 % PM (*Sestak I et al., 2012*). Neprokázali jsme statisticky významný vliv CYP2D6 fenotypu na míru výskytu jakýchkoliv NÚ, a potvrdili jsme tím závěry dříve publikovaných prací (tyto se týkaly pouze vztahu polymorfismů CYP2D6 a výskytu vasomotorických NÚ – návalů, ne další námi sledovaných NÚ!) (*Henry NL. et al., 2009, Ramón Y. et al., 2010, Sestak I et al., 2012, Baxter SD et al., 2014, Zembutsu H et al., 2016*). Zaznamenaná tendence k prodloužení doby do objevení neselektovaných NÚ u variantních polymorfismů CYP2D6 ($p = 0.183$) a zkrácení doby do nástupu neselektovaných NÚ v případě ko-medikace inhibitory CYP2D6 ($p = 0.1714$), rovněž koreluje s publikovanými studiemi, které potvrzují častější návaly (hot flush) u EM fenotypu a naopak lepší snášenlivost tamoxifenu u PM fenotypu (*Goetz MP et al., 2005, Rae JM et al., 2007, Newman WG et al., 2008*).

Polymorfismus *rs2032582 ABCB1* genu pro P-gp nebyl dosud v souvislosti s výskytem NÚ při terapii tamoxifenem systematicky studován. Proto diskutuji pouze naše závěry. Při srovnání polymorfismu *exonu 21* mezi skupinou pacientek s a bez NÚ byl u pacientek s NÚ prokázán vyšší výskyt žen s variantními alelami ($p = 0,0026$), který ale následně vymizel po sloučení variant s minoritně zastoupenou variantní alelou *A* a více zastoupenou variantní alelou *T*. I po sloučení variant jsme zaznamenali výraznou tendenci ke statistické významnosti ($p = 0.089$). Při srovnání vlivu polymorfismu *exonu 21* na dobu do objevení neselektovaných NÚ (TTE) jsme pozorovali trend k prodlužování doby

do objevení NÚ u wt – homozygotek přes heterozygotky směrem k vt-homozygotkám. Statistická analýza následně potvrdila opět pouze trend ke zkrácení doby do objevení NÚ u wt homozygotek ($p = 0.1300$). Tento závěr nepotvrdil náš předpoklad statisticky, ale trend naznačuje určitý vliv polymorfismu *exonu 21* na míru a rychlost objevení NÚ.

Statistické hodnocení vlivu polymorfismu *rs1045624* genu *ABCB1* na TTE prokázalo jasnou statistickou signifikanci ($p = 0.0106$, $\chi^2 = 9.0960$), ale pouze pro gynekologické a vasomotorické NÚ ($p = 0.0221$, HR = 1.0588), bez prokázaného vlivu na výskyt a nástup žilních komplikací. Tyto výsledky by podporovaly závěr Teha a kolektivu, který prokázal, že snížení exprese P-gp u vt-homozygotek vede k předpokládanému snížení eliminace tamoxifenu a jeho aktivních metabolitů, tím k prodloužení jeho působení a vyšší účinnosti terapie tamoxifenem (Teh LK. *et al.*, 2012). O důvodu statistické významnosti pouze pro gynekologické a vasomotorické NÚ můžeme pouze spekulovat. Zda se jedná o rozdílnou expresi P-gp v endometriu a žilní stěně, nebo je tato rozdílnost pouze výsledkem určité deviace u některého ze zkoumaných skupin NÚ vyžaduje další zkoumání.

6 ZÁVĚR

Na podkladě našich výsledků odpovídáme na naše hypotézy následovně:

- 1) **Nebyl prokázán** vyšší výskyt relapsů nemoci respektive kratší doba do vzniku relapsu (TTE) ve skupině pacientek s výskytem variantních alel *CYP2D6* (PM a IM) ve srovnání s pacientkami s fenotypem UrM a EM. Opakovaně byl ale zaznamenán jasný statistický trend ke zkrácení TTE pro plně variantní genotypy (PM);
- 2) **Nebyl prokázán** vliv ko-medikace inhibitory ani induktory *CYP2D6* u pacientek na terapii tamoxifenem. Ale opět opakovaně byl zaznamenán trend k statistické signifikanci v případě inhibitorů *CYP2D6*;
- 3) Statisticky **byl potvrzen významný vliv polymorfismu *rs1045624* genu *ABCB1* pro P-gp, ale pouze v premenopauzálním souboru (prodloužení TTE u wt-homozygotek: $p = 0.0005$, 95% CI 1.6620 – 6.1528), který nebyl potvrzen v celém sledovaném souboru ani podsouboru postmenopauzálních pacientek. Nebyl jasně prokázán vliv polymorfismu *rs2032582* *ABCB1* genu pro P-gp na účinnost terapie tamoxifenem, ale byly opakovaně zaznamenány trendy ke zkrácení TTE u wt- homozygotek ($p = 0.1006$) ;**
- 4) **Byl prokázán statisticky významný vliv polymorfismu *rs1045624* na vznik a dobu do objevení NÚ (rychlejší nástup NÚ ve skupině wt-homozygotek), ale pouze v souboru pacientek s gynekologickými komplikacemi ($p = 0.0221$, HR = 1.0588).**

Závěrem mohu konstatovat, že výsledky naší práce podporují „negativní studie“ téměř ve všech zkoumaných bodech a obecně vzato nebyla, kromě málo prozkoumaného vlivu polymorfismů *exonu 26* na vznik a vývoj NÚ, nalezená žádná jasná a průkazná statistická závislost mezi sledovanými polymorfismy a efektem terapie nebo výskytem NÚ při terapii tamoxifenem. Naznačené opakované a jasné statistické trendy nás ale vedou k závěru, že „genotypem řízená hormonální terapie“ není pouhou „slepou uličkou“, jak se zdálo v posledních letech, ale možnou reální cestou nových prediktorů vedoucích k zefektivnění hormonální terapie u karcinomu prsu, což potvrzují poslední vyjádření odborných společností. Na základě našich výsledků a hodnocení dostupných publikovaných výsledků se domníváme, že účinnost terapie tamoxifenem řídí velmi pravděpodobně „komplexní genotyp“, tj. soubor vícero polymorfismů zahrnutých

do kompletního metabolismu, transportu a eliminace tamoxifenu. Další cestu výzkumu vidíme v prozkoumání celého spektra potenciálních polymorfismů *CYP2D6*, *CYP3A4*, *ABCB1*, *OATP1B1* a ko-medikace ovlivňující *CYP2D6* a jejich vliv na efekt tamoxifenu i výskyt nežádoucích účinků v randomizované, prospektivní multicentrické studii.

7 REFERENCE

- Abraham JE**, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Earl HM, Dunning AM, Pharoah PD, Caldas C (2010) CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res.* **12**: R64
- Aebi S**, Davidson T., Gruber G, Carduso F (2011) On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines For diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology.* **22**(Suplement 6): vi12 – 24
- Ahern TP**, Pedersen L, Cronin-Fenton DP, Sørensen HT, Lash TL (2009) No increase in breast cancer recurrence with concurrent use of tamoxifen and some CYP2D6 – inhibiting medications. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**: 2562 – 4
- Ambudkar SV**, Kimchi-Sarfaty Ch, Sauna ZE, Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**: 7468 – 85.
- Anghel A**, Raica M, Marian C, Ursoniu S, Mitrasca O. (2006) Combined profile of the tandem repeats CAG, TA and CA of the androgen and estrogen receptor genes in the breast cancer. *J Cancer res Clin Oncol.* **132**: 727-33
- Anzenbacher P**, Anzenbacherová E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cel. Mol. Life Sci.* **58**: 737 – 47
- Aubert RE**, Stanek EJ, Yao J, Teagarden JR, Subar M, Epstein RS, Skaar TC, Desta Z, Flockhart DA (2009) Risk of breast cancer recurrence in women initiating tamoxifen with CYP2D6 inhibitors. *J. Clin. Oncol.* **27**: (18S), CRA508. ASCO Annual Meeting Proceedings Part I
- Bardia A**, Stearns V (2010) Personalized Tamoxifen: A Step Closer but Miles To Go. *Clin Cancer Res* **16**: 4308 – 10
- Baxter SD**, Teft WA, Choi YH, Winquist E, Kim RB (2014). Tamoxifen-associated hot flash severity is inversely Correlated with endoxifen concentration and CYP3A4*22. *Breast Cancer Res Treat.* 145(2):419-428

- Beelen K**, Opdam M, Severson TM, Koornstra RTh, Vincent AD, Hauptmann M, van Schajk RHN, Berns EMJJ, Vermorken JB, van Diest PJ, Linn SC (2013). CYP2C19 *2 predicts substantial tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen and no systemic treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**: 649-55
- Bertz RJ**, Granneman GR (1997) Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.* **32**: 210 – 58
- Bijl MJ**, van Schaik RHN, Lammers LA, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker bych, Visser LE (2009) The CYP2D6*4 polymorphism affect breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**: 125 – 30
- Bonanni B**, Macis D, Maisonneuve P, Johansson HA, Gucciardo G, Oliviero P, Travaglini R, Muraca MG, Rotmensz N, Veronesi U, Decensi AU (2006) Polymorphism in the CYP2D6 tamoxifen-metabolizing gene influences clinical effect but not hot flashes: data from the Italian Tamoxifen Trial. *J Clin Oncol.* **24**: 3708-9; author reply 3709
- Borges S**, Desta Z, Li L, Skaar TC Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff DM, Wu L, Hillman G, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA (2006) Quantitative effect of CYP2D6 genotype and Inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimalization of breast cancer treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**: 61 -74
- Bradford LD** (2002) CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* **3**: 229 – 43
- Brauch H**, Schroth W, Eichelbaum M, Schwab M, Harbeck N (2008) Clinical Relevance of CYP2D6 Genetics for Tamoxifen Response in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* **3**: 43 – 50
- Brauch H**, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M (2009) Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin. Chem* **55**: 1770 – 82
- Brockdorff BL**, Skouv J, Reiter BE, Lykkesfeldt AE (2000) Increased expression of cytochrome P450 1A1 and 1B1 genes in anti-estrogen-resistant human breast cancer cell lines. *Int J Cancer* **88**:902 – 6

- Burstein HJ**, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Rowden D, Solky AJ, Stearns V, Winter EP, Griggs JJ (2014). Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* **32**: 2255-69
- Buzkova H**, Pechandova K, Slanar O, Perlik F (2008) Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem. Funct.* **26**: 76 – 81
- Cascorbi I**, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I (2001). Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR 1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* **69**: 169 – 74
- Cizmarikova M**, Wagnerova M, Schono L, Habalova V, Kohut A, Linkova A (2010) MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcomes. *Pharmacogenetics.* **10**: 62-9
- Colomer R**, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, Calvo L, Carabantes F, Crespo C, Muñoz M, Liombart A, Plazila A, Artells R, Gilbert M, Lloveras B, Alba E (2008) A single nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin. Canc. Res.* **14**: 811 – 6
- Coller J.**, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nüssler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Mürdter TE (2002) The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **54**: 157 – 167
- Coon MJ**, Ding XX, Pernecky SJ, Vaz AD (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**: 669 – 73
- Crespi CL**, Miller VP (1997) The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH. Cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* **7**: 203 – 210
- Crewe KH**, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT (1997). Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9, 3A4 to the 4 – hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes *Biochem Pharmacol* **53**: 171 – 8

- Crewe KH**, Notley NM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EMJ (2002) Metabolism of tamoxifen by Recombinant human cytochrome P450 enzymes: Formation of the 4 - hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans - 4 hydroxytamoxifen. *Drug metabolism and disposition* **30**: 869 – 74
- Cronin-Fenton DP**, Damkier P, Lash TL (2014). Metabolism and Transport of tamoxifen in relation to its effectiveness: new perspectives on a ongoing controversy. *Future Oncol.* **10**(1):107-22
- Cuzick J**, Sestak I, Cella D, Fallowfield L (2008) ATAC Trialists' Group Treatment Emergent endocrine symptoms and the risk of breast cancer recurrence: a retrospective analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* **9**(12):1143-48
- De Vries Schultink AHM**, Zwart W, Linn SC, Beijnen JH, Huitema ADR (2015). Effects of Pharmacogenetics on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tamoxifen. *Clin Pharmacokinet.* **54**:797-810
- Dehal SS and Kupfer D** (1997) CYP2D6 catalyses tamoxifen – 4 – hydroxylation in human liver. *Cancer Res* **57**: 3402 – 6
- Del Re M**, Michelucci A, Simi P, Danesi R (2012) Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer Res Rev* **38**: 442 -50
- Del Re M**, Citi V, Crucitta S, Rofi E, Belcari F, van Shaik RH, Danesi R (2016). Pharmacogenetics of CYP2D6 and tamoxifen therapy: Light at the end of the tunnel? *Pharmacol. Res.* **107**: 398-406
- Demodaran SE**, Prathan SC, Umamaheswaran G, Kadambari D, Reddy KS, Adithan C. (2012) Genetic polymorphisms of CYP2D6 increase the risk for recurrence of breast cancer in patients receiving tamoxifen as an adjuvant therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **70**(1): 75-81
- Desta Z**, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA (2002) Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* **41**: 913 – 58
- Dezentje VO**, Guchelaar HJ, Nortier JW, van de Velde CJ, Gelderblom H (2009) Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**: 15 – 21

- Dezentje VO**, van Blijderveen NJ, Gelderblom H, Putter H, van Herk-Sukel MP, Casparie MK, Egberts AC, Nortier JW, Guchelaar HJ (2010) Effect of concomitant CYP2D6 inhibitor use and tamoxifen adherence on breast cancer recurrence in early-stage breast cancer. *J.Clin. Oncol.* **28**: 2423 – 9
- Dezentjé VO**, Opdam FL, Hartingh J, Van der Straaten T, Vree R, Maartense E, Smorenburg CH, Putter H, Dieudonné AS, Neven P, Van de Velde CJH, Nortier JWH, Guchelaar H-J (2015) CYP2D6 genotype- and endoxifen-guided tamoxifen dose escalation increases endoxifen serum concentrations without increasing side effects. *Breast Cancer Research and Treatment.* **153**(3):583-90
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005)** Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for early breast cancer on recurrence and 15 - year survival: an overview of the Randomised trials. *Lancet* **365**: 1687 – 1717
- Falany CN**, Wheeler J, Oh TS, Falany JL (1994) Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **48**: 369 -75
- Falany JL**, Pilloff DE, Leyh TS, Falany CN (2006) Sulfation of raloxifene and 4 - hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases. *Drug Metab Dispos* **34**: 361 - 8
- Ferraldeschi R**, Newman WG (2010) The Impact of CYP2D6 Genotyping on Tamoxifen Treatment. *Pharmaceuticals* **3**: 1112 – 38
- Ferro P**, Forlani A, Muselli M, Pfeffer U (2003) Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanism of exon skipping. *Int J Mol Med.* **12**:355-63
- Fiegl H**, Millinger S, Muller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M (2005) Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res.* **65**:1141-5
- Forbes JF**, Cuzik J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M, Arimidex, Tamoxifen, Alone or in combination (ATAC) Trialists' Group (2008) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer. *Lancet Oncol.* **9**: 45 – 53
- Fromm M** (2004) Importance of P-glycoprotein and blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 423 – 9

- Gaedigk A**, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS (1999) Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* **9**: 669 – 682
- Garcia-Martin E**, Martinez C, Ladero JM, Agundez JA (2006) Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals. *Mol Diagn Ther* **10**: 29 – 40
- Giacinti L**, Claudio PP, Lopez M. (2006) Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Oncologist*. **11**:1-8
- Girault I**, BiecheI, Lidereau R (2006) Role of estrogen receptor transcriptional. Coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer. *Maturitas*. **54**:342-51
- Goetz MP**, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, Desta Z, Perez EA, Ingle JN (2005) Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin. Oncol.* **23**: 9312 – 8
- Goetz MP**, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch CJ, Lingle WL (2007) The impact of cytochrome CYP2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**:113 – 21
- Goetz MP**, Sun JX, Suman VJ, Silva GO, Perou CM, Nakamura Y, Cox NJ, Stephens PJ, Miller VA, Ross JS, Chem D, Safgren SL, Kuffel MJ, Ames MM, Kalari KR, Gomez HL, Gonzales-Angulo AM, Burgues O, Brauch HB, Ingle JN, Ratain MJ, Yelensky R (2015). Loss of Heterozygosity at the CYP2D6 Locus in Breast Cancer: Implications for Germline Pharmacogenetic studies. *JNCI J Natl. Cancer Institut* . 107(2): doi:10.1093/jnci/dju401
- Goetz MP**, Ratain M, Ingle JN (2016). Providing Balance in ASCO Clinical Practice Guidelines: *CYP2D6* Genotyping and Tamoxifen Efficiency. *Journal of Clinical Oncology*. **34**(32) 3944-45
- Gonzales FJ**, Korzekwa KR (1995) Cytochromes P450 expression system. *Rev. Toxicol. Pharmacol.* **35**: 369 – 90

- Gonzalez-Santiago S**, Zárate R, Haba-Rodríguez J, Gómez A, Bandrés E, Moreno S, Bodega P, García-Foncillas J, Aranda E (2007) CYP2D6*4 polymorphism as blood predictive biomarker of breast cancer relapse in patients receiving adjuvant tamoxifen. *J. Clin. Oncol.* 25(18S): abstract 590. ASCO Annual Meeting Proceedings Part I
- Gottesman MM**, Pastan I, Ambudkar SV (1996) P -glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 610 – 17
- Guengerich FP (1991)** Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. *J Biol. Chem.* 266:10019 – 22
- Guengerich FP (1995)** Human cytochrome P450 enzymes. V: Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry. 473 – 535, Ortiz de Montellano (ed.), Plenum, New York
- Guengerich FP**, Johnson WW (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* 36: 14741 – 50
- Guengerich FP (2001)** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to the metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14:611 – 50
- Hakkola J**, Pasanen M, Hukkanen J, Pelkonen O, Mäenpää J, Edwards RJ, Boobis AR, Raunio H (1996) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem. Pharmacol.* 51: 403 – 11
- Hartman AR**, Helft P (2007) The ethics of CYP2D6 testing for patients considering tamoxifen. *Breast Cancer Res.* 9:103
- Heilberg IP**, Hernandez E, Alonzo E (2005) Estrogen receptor gene polymorphism may predict the bone mineral density response to raloxifene in postmenopausal women on chronic hemodialysis. *Ren Fail.* 27: 155-61
- Hellmold H**, Flander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M, Gustafsson JA (1998) Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammaplastics. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 886 – 95
- Helguero LA**, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA (2005) Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene.* 24(44): 6605 – 16

- Henry NL**, Rae JM, Li L, Azzouz F, Skaar TC, Desta Z, Sikora MJ, Philips S, Nguyen AT, Storniolo AM, Hayes DF, Flockhart DA, Stearns V, Consortium on Breast Cancer Pharmacogenomics Investigators (2009) Association between CYP2D6 genotype and tamoxifen-induced hot flashes in a prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat.* **117** (3): 571-75
- Herrington DM**, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA (2002) Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy of E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation.* **105**:1879-82
- Hertz DL**, Rae JM (2016). One step at a time: CYP2D6 guided tamoxifen treatment awaits convincing evidence of clinical validity. *Pharmacogenomics.* **17**(8):823-6
- Higgins MJ**, Rae JM, Flockhart DA, Hayes DF, Stearns V (2009) Pharmacogenetics of Tamoxifen: Who Should Undergo CYP2D6 Genetics Testing? *J Natl. Compr Canc Netw.* **7**: 203 – 13
- Hoffmeyer S**, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 3473 – 8
- Holzman D** (2009) Tamoxifen, antidepressants, and CYP2D6: the conundrum continues. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**: 1370 – 71
- Howell A**, Cuzik J, Baum M, et al; ATAC Trialists' Group (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* **365**: 60 – 2
- Chu W**, Fyles A, Sellers EM, McCready DR, Murphy J, Pal T, Narod SA (2007) Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer tamoxifen use. *Carcinogenesis* **28**: 2139 – 42
- Ioannides C**, Parke DV (1993) Induction of cytochrome P450 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug. Metab. Rev.* **25**: 485 – 501
- Ingelman-Sundberg M** (2001) Genetics susceptibility to adverse effect of drug and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* **482**: 11-19

- Ingelman-Sundberg M (2005)** Genetics polymorphisms of cytochrome P450 2d6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* **5**: 6 – 13
- Ingle JN (2008)** Pharmacogenomics of Tamoxifen and Aromatase Inhibitors. *Cancer* **112**:695 – 9
- Irvin WJ Jr, Walko CM, Weck KE, Ibrahim JG, Chiu WK, Dees EC, Moore SG, Olajide OA, Graham ML, Canale ST, Raab RE, Corso SW, Peppercorn JM, Anderson SM, Friedman KJ, Ogburn ET, Desta Z, Flockhart DA, McLeod HL, Evans JP, Carey LA (2011)** Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J Clin Oncol.* **29**(24): 3232-9
- Ismail R, Teh LK, Amir J, Alwi Z, Lopez CG (2003)** Genetic polymorphism of CYP2D6 in Chinese subjects in Malaysia. *J Clin. Pharm. Ther.* **28**:279 – 84
- Iusuf D, Teunissen SF, Wagenaar E, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2011)** P-glycoprotein (ABCB1) Transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4 – hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **337**: 710 – 7
- Jacotot F, Simon I, Dreano Y, Beaune P, Riche C, Berthous F (1991)** Identification of the cytochrome P450IIIA family as the enzymes involved in the N-desmethylation of tamoxifen in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **41**:1911 – 19
- Jain KK:** Textbook of Personalized Medicine. Springer, (2009). 430 s
- Jarvinen TA, Peltö-Huikko M, Holli K, Isola J (2000)** Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* **156**(1): 29-35
- Jenšovský J (2002)** Selektivní modulátory estrogenových receptorů. *Postgraduální medicína.* **2**: 579-82
- Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler S, Weinshilboum RM, Rae JM, Haydes DF, Flockhart DA (2005)** CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl. Cancer Inst.* **97**: 30 – 9

- Johne A**, Köpke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel Ch, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmöller J, Cascorbi I, Rous I (2002) Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P – glycoprotein MDR1 gene. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**: 584 – 94
- Johnson WW (2008)** Cytochrome P450 inactivation by pharmaceuticals and phytochemicals: therapeutic relevance. *Drug Metab. Rev.* **40**: 10 – 47
- Johnson MD**, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC (2004) Pharmacological characterization of 4 – hydroxy – N – desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **85**: 151 - 159
- Johnson JA**, Hamadeh IS, Langaee TY (2015). Loss of heterozygosity at the CYP2D6 Locus in Breast Cancer: Implications for Tamoxifen Pharmacogenetic Studies. *JNCI J Natl Cancer Inst.* **107**(2) dju437. doi: 10.1093/jnci/dju437
- Jordan VC**, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G (1977) A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J. Endocrinol.* **75**: 305-16
- Jung JA**, Lim HS (2014). Association between CYP2D6 genotypes and the clinical outcomes of the adjuvant tamoxifen for breast cancer: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* **15**: 49-60
- Kafka A**, Sauer G, Jaeger C, Grudmann R, Kreienberg R, Zellinger R (2003) Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int. J. Oncol.* **22**: 1117-21
- Kaku T**, Ogura K, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A (2004) Quaternary ammonium-linked glucuronidation of tamoxifen by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol* **67**: 2093 – 102
- Kato M**, Fukuda T, Serretti A, Wakeno M, Okugawa G, Ikenaga Y, Hosoi Y, Takekita Y, Mandelli L, Azuma J, Kinoshita T (2008) ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* **32**: 398 – 404
- Kelleher D**, Farrell R, McManus R (2004) Pharmacogenetics of inflammatory bowel disease. *Novartis Found Symposium.* **263**: 41-53

- Kelly CM, Jurlink DN, Gomes T, Duong-Hua M, Pritchard KI, Austin PC, Paszat LF (2010)** Selective serotonin reuptake inhibitors and breast cancer mortality in women receiving tamoxifen: a population based cohort study. *BMJ* **340**: c693
- MacLeod AK, McLaughlin LA, Henderson CJ, Wolf CR (2016)** Application of mice humanised for cytochrome P450 CYP2D6 to the study of tamoxifen metabolism and drug-drug interaction with antidepressants. *Drug Metabolism and Disposition*. 44(12) : DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.116.07343>
- Kim RB, Lezme BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Pylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schulz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR (2001)** Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70: 189-99
- Kimmick GG, Lovato J, McQuellon R, Robinson E, Muss HB (2006)** Randomized, double-blind, placebo - controlled, crossover study of sertraline (Zoloft) for the treatment of hot flashes in women with early stage breast cancer taking tamoxifen. *Breast. J.* **12**: 114 – 22
- Kirchheiner J (2008)** CYP2D6 phenotype prediction from genotype: which system is the best? *Clin.Pharmacol. Ther.* **83**:225 – 7
- Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, Kubo M, Nakamura Y, Zembutsu H (2008)** Impact of CYP2D6*10 on recurrence- free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci.* **99**: 995 – 9
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsumoda T, Kubo M, Tanigawara Y, Flockhart DA, Desta Z, Skaar TC, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H (2010)** Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on Clinical Outcomes of Adjuvant Tamoxifen Therapy for Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology.* **28**: 1287 – 93
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H (2012)** Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* . 131: 137-45

- Kocabas NA**, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Karakaya AE (2002) Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population. *Arch Toxicol.* **76**: 643 – 9
- Lamba JK**, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A – mediated metabolism. *Adv Drug Deliv. Rev.* **54**:1271- 94.
- Lammers LA**, Mathijssen RHJ, Gelder TV, Bijl MJ, Graan AJM, Seynaeve C, Fessem MAV, Berns EM, Vulto AG, Schaik RHN (2010). The impact of CYP2D6-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* **103**(6): 765-71
- Lang T**, Klein K, Fischer J, Nüssler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2001) Extensive genetic polymorphism in the human *CYP2B6* gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* **11**: 399 – 415
- Lee AJ**, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT (2001) Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17 β – estradiol to multiple metabolites by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome P450 3A4 and 3A5. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **298**:420 – 32
- Lee CR**, Goldstein JA, Pieper JA (2002) Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* **12**:251- 63
- Lei L**, Wang X, Wu X-D, Wang Z, Chen ZH, Zheng Y-B, Wang X-J (2016) Association of CYP2D6*10 (c.100C >T) polymorphisms with clinical outcome of breast cancer after tamoxifen adjuvant endocrine therapy in Chinese population.. *Am J Transl Res.* **8**(8): 3585-92
- Leslie EM**, Deeley RG, Cole SPC (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**: 216 – 37
- Lim YC**, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC (2005) Endoxifen (4 – hydroxy – N – desmethyltamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4 – hydroxytamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**: 471 – 8

- Lim YC**, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA, Skaar TC (2006) Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 503 – 512
- Lim YC**, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RCH, Wong NS, Wong M, Lee EJD, Chowbay B (2011). Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 a CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* **71**:737-50
- Lim HS**, Lee K, Sook EL, Jang IJ, Ro J (2007) Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin. Oncol.* **25**:3837- 45
- Lopez-Guerrero JA**, Garcia-Casado Z, Guerrero-Zoltano AL, Calatrava A, Ruin-Sauri A, Fernandez-Serra A, Ruin A, Llombart-Bosch A, Guillem-Porta V, Llombart-Cussac A (2007) Corroboration of polymorphisms in the aromatase (CYP19A1) gene with response to neoadjuvant therapy with letrozole in postmenopausal women with stages II-IV/PgR-positive breast cancer [abstract 602]. *Pro, Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**:602
- Loprinzi CL**, Sloan JA, Perez EA, Quella SK, Stella PJ, Mailliard JA, Halyard MY, Pruthi S, Novotny PJ, Rummans TA (2002) Phase III evaluation of fluoxetine for treatment of hot flushes. *J Clin Oncol.* **20**: 1578 – 83
- Loprinzi CL**, Sloan J, Sterans V, Slack R, Iyengar M, Diekmann B, Kimmick G, Lovato J, Gordon P, Pandya K (2009) Newer antidepressants and gabapentin for hot flushes: an individual patient pooled analysis. *J Clin. Oncol.* **27**: 2831- 37
- Lynch T**, Price A (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am.Fam.Physician* **76**:391- 6
- Ma CX**, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pelleymounter L, Wang L, Eckloff BW, Schod D, Weiben ED, Adjei AA, Weinshilboum RM (2005) Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* **65**: 11071-82
- Marzolini C**, Paus E, Buclin T, Kim RB. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**: 13 – 33

- McFayden MCE**, Breeman S, Payne S, Stirk C, Miller ID, Melwin WT, Murray GI (1999) Immunohistochemical localization of cytochrome P450 1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1 . *J Histochem Cytochem* **47**:1457 – 64
- Mac Leod AK**, Mc Laughlin LA, Henderson CJ, Wolf CR.(2016) Application of mice humanised for cytochrome P450 CYP2D6 to the study of tamoxifen metabolism and drug-drug interaction with antidepressants *Drug Metabolism and Disposition*. 44(12) : DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.116.07343>
- Miller WR** (1997) Aromatase Inhibitors and Breast Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **23**:171-87
- Mortimer JE**, Flatt SW, Parker BA, Gold EB, Wasserman L, Natarajan L, Pierce JP (2008) WHEL Study Group Tamoxifen, hot flashes and recurrence in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.***108** (3):421-26
- Murray GI**, Taylor MC, McFayden MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melwin WT (1997) Tumor-specific expression of cytochrome 1B1. *Cancer Res* **57**: 3026 – 31
- Mwinyi J**, Vokinger K, Jetter A, Breitenstein U, Hiller C, Kullak-Ublick GA, Trojan A (2014). Impact of nvariable CYP genotypes on breast cancer relapse in patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **73**: 1181-8
- Nishiyama T**, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A (2002) Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of cis- and trans-4-hydroxytamoxifens by human liver UDP – glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem Pharmacol.* **63**: 1817 – 30
- Nelson DR**, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okada K, Nebert DW (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**: 1- 51
- Nelson DR** (1999) Cytochrome 450 and the Individuality of Species. *Archives of Biochem. And Biophysics* **369**:1-10
- Neville AM**, Bettelheim R, Gelber RD et al (1992) Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.***10**:696-705

- Newman WG**, Hadfield KD, Latif A, Roberts SA, Shenton A, McHague C, Lalloo F, Howell S, Evans DG (2008) Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* **14**: 5913 – 8
- Nishiyama T**, Ogura K, Nakano H, Ohnuma T, Kaku T, Hiratsuka A, Muro K, Watabe T (2002) Reverse geometrical selectivity in glucuronidation and sulfation of *cis*- and *trans* – 4 - hydroxytamoxifens by human liver UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases. *Biochem. Pharmacol.* **63**: 1817 - 30
- Nowell S**, Sweeney C, Winters M, Stone A, Lang PN, Hutchins LF, Kadlubar FF, Ambrosone ChB (2002) Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Ins.* **94**: 1635 – 40
- Nowell SA**, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, MacLeod SL, Kadlubar FF, Ambrosone CB (2005) Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **91**: 249 – 58
- Nowell S**, Falany CN (2006) Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene* **25**:1673-78
- Nuwaysir EF**, Dragan YP, Jefcoate CR, Jordan VC, and Pitot HC (1995) Effects of tamoxifen administration on the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Cancer Res* **55**: 1780 – 1786
- Nyakutira C**, Roshammar D, Chigutsa E, Chonzi P, Ashton M, Nhachi C, Masimirembwa C (2008) High prevalence of the CYP2B6 516G3T(*6) variant and effect on the population pharmacokinetics of efavirenz in HIV/AIDS outpatients in Zimbabwe. *Eur J Clin. Pharmacol.* **64**: 357 – 65
- Ogura K**, IshikawaY, Kaku T, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, Hiratsuka A (2006) Quaternary ammonium - linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 1358 – 69

- Okishiro M**, Taguchi T, Jin KS, Shimazu K, Tamaki Y, Noguchi S. (2009). Genetic polymorphisms of CYP2D6 *10 and CYP 2C19*2, *3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*. **115**:952-61
- Onland-Morret NC**, van Gilst CH, Roest M (2005) The estrogen receptor α gene and breast cancer risk. *Cancer Causes Control*. **16**:1195-202
- Osborne CK**, Wiebe VJ, McGuire WL, Ciocca DR, DeGregorio MW (1992) Tamoxifen and the isomers of 4 – hydroxytamoxifen in tamoxifen-resistant tumors from breast cancer patients. *J Clin. Oncol*. **10**: 304 – 10
- Oyama T**, Morita M, Isse T, Kagawa N, Nakata S, So T, Mizukami M, Ichiki Y, Ono K, Sugava M, Uramoto H, Yoshimatsu T, Hanagiri T, Sugio K, Samoto T, Yasumoto K (2005) Immunohistochemical evaluation of cytochrome P450 (CYP) and p53 in breast cancer. *Front Biosci* **10**: 1156 – 61
- Park BK**, Pirmohamed M, Kitteringham NR (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther*. **68**: 385 – 424
- Pechandová K**, Buzková H, Slanař O, Perlík F (2006) Efluxní transembránový transporter-P-glykoprotein. *Klin. Biochem. Metab* **14**: 196 – 201
- Pinho JRR**, Sitnik R, Manguera CLP (2014) Personalized medicine and the clinical laboratory. *Scielo*. 12(3): <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082014RW2859>
- Province MA**, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H, Mushiroda T, Newman WG, Lee M-TM, Ambrosone CB, Beckman MW, Choi J-Y, Dieudonné A-S, Fasching PA, Ferraldeschi R, Gong L, Haschke-Becher E, Howell A, Jordan LB, Jordan LB, Hamann U, Kiyotani K, Krippi P, Lambrechts D, Latif A, Langsenlehner U, Lorzio W, Neven P, Nguyen AT, Park B-W, Purdie CA, Quinlan P, Renner W, Schmidt M, Schwab M, Shin J-G, Stingl JC, Wegman P, Wingren S, Wu AHB, Ziv E, Zirpoli G, Thompson AM, Jordan VC, Nakamura Y, Altman RB, Ames MM, Weinshilboum RM, Eichelbaum M, Ingle JN, Klein TE, International Tamoxifen Pharmacogenomics Consortium (2013) CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-Analysis of Heterogeneous Study Populations. *Clinic Pharmacol and Therap*. **95**: 216-27

- Punglia RS**, Burstein HJ, Winer EP, Weeks JC (2008) Pharmacogenomic Variation of CYP2D6 and the Choice of Optimal Adjuvant Endocrine Therapy for Postmenopausal Breast Cancer: A Modeling Analysis. *J Natl. Cancer Inst.* **100**: 642 – 8
- Rae JM**, Sikora MJ, Henry NL, Li L, Kim S, Oesterreich S, Skaar TC, Nguyen AT, Desta Z, Storniolo AM, Flockhart DA, Hayes DF, Stearns V (2007) Cytochrome P450 2D6 activity predicts adherence to tamoxifen Therapy [abstract]. *Breast Cancer Res. Treat.* **106**: S21
- Rae JM**, Drury S, Hayes DF, Stearns V, Thibert JN, Haynes BP, Salter J, Sestak I, Cuzick J, Dowsett M; ATAC trialists (2012). CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl. Cancer Inst.* **104(6)**: 452-60
- Regan MM**, Leyland-Jones B, Bouzyk M, Pagani O, Tang W, Kammler R, Dell'Orto P, Biasi MO, Thürlimann B, Lyng MB, Ditzel HJ, Neven P, Debled M, Maibach R, Price KN, Gelber RD, Coates AS, Goldhirsch A, Rae JM, Viale G (2012) CYP2D6 Genotype and Tamoxifen Response in Postmenopausal Women with Endocrine-Responsive Breast Cancer: The Breast International Group 1-98 Trial. *JNCI*. **104(6)**: 441-51
- Ramón Y**,Cajal T, Altés A, Paré L, del Rio E, Alonso C, Barnadas A, Baiget M (2010) Impact of CYP2D6 polymorphisms in tamoxifen adjuvant breast cancer treatment. *Breast Cancer Res. Treat.* **119**: 33-38
- Rendic S**, DiCarlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **29**: 413 – 580
- Reyes Leó-Cachón RB**, Ascacio-Martínez JÁ, Barrera-Saldaña HA (2012) Individual response to drug therapy:bases and study approaches. *Rev Invest Clin* **64 (4)**: 364-76
- Robertson JF**, Nicholson R, Bundred NJ (2001). Comparison of the short-term biological effects of 7alpha [9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)- nonyl]estra-1,3,4(10)-triene-3,17beta-diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res.* **61**: 6739-46
- Rodriguez-Antona C**, Ingelman- Sundberg M (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer *Oncogene* **25**:1679 – 91

- Rolla R**, Vidali M, Meola S, Pollarolo P, Fanello MR, Nicolotti C, Saggia C, Forti L, Agostino FD, Rossi V, Borra G, Stratica F, Alabiso O, Bellomo G (2012) Side effects associated with ultrarapid cytochrome P450 2D6 genotype among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *Clin Lab*. **58(11-12)**:1211-8
- Romero-Lorca A.**, Novillo A, Gaibar M, Bandrés F, Fernández-Santader A (2015). Impact of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer. *PLoS ONE*.10(7): e0132269. doi: 10.1371/journal.phone.0132269
- Rosen PP**, Groshen S, Saigo PE et al (1989) Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol*. **7**:1239-51
- Rosenberg MF**, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem*. **16**: 10685 – 94
- Sachse C**, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1997) Cytochrome P4502D6 variants in Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am. J Hum. Genet*. **60**: 284 – 95
- Saintot M**, Malaveille C, Hautefeuille A, Gerber M (2003) Interactions between genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1, sulfotransferase 1A1, catechol-o-methyltransferase and tobacco exposure in breast cancer risk. *Int J Cancer* **107**: 652 – 7
- Sakaeda T**, Nakamura T, Okumura K (2003) Pharmacogenetics of MDR – 1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* **4**: 397- 410
- Saladores P**, Mürdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, Ganchev B, Eccles B, Gerty S, Tfayli A, Lim JSL, Yap YS, Ng RCH, Wong NS, Dent R, Habbal MZ, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schroth W, Schwab M, Brauch (2015) Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *The Pharmacogenomics Journal*.**15**, 84-94

- Sestak I**, Kealy R, Edwards R, Forbes J, Cuzick J (2006) Influence of hormone replacement therapy on tamoxifen-induced vasomotor symptoms. *J Clin Oncol.* **24 (24)**:3991- 96
- Sestak I**, Kealy R, Nikoloff M, Fontecha M, Forbes JF, Howell A, Cuzick J (2012). Relationships between CYP2D6 phenotype, breast cancer and hot flushes in women at high risk of breast cancer receiving prophylactic tamoxifen: results from the IBIS-I trial. *British Journal of Cancer.* **107**: 230 – 33
- Seelig A** (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **251**: 252 – 61
- Shang Y**, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**: 843 – 52
- Shaik S**, de Visser SP (2003) In Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry, 3rd ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Plenum Press: New York; Chapter 2
- Shimada T**, Tsumura F, Gillam EMJ, Guengerich FP, Inokue K (2000) Roles of NADPH- P450 Reductase in the O- deethylation of 7 – ethoxycumarin by recombinant human cytochrome P450 1B1 variants in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* **20**: 73 – 80
- Shin A**, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, Noh DY, Choe KJ, Ahn SH, Hirvonen A, Kim JH, Yoo KY (2003) Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* **80(1)**: 127- 31
- Schroth W**, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H (2007) Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin. Oncol.* **25**: 5187 – 93
- Schroth W**, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM, Safgren SL, Kuffel MJ, Ulmer HU, Boländer J, Strick R, Beckmann MW, Koelbl H, Weinshilboum RM, Ingle JN, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H (2009) Association Between CYP2D6 Polymorphisms and Outcomes Among Women With Early Stage Breast Cancer Treated With Tamoxifen. *JAMA* **302**: 1429 - 36

- Simon I**, Berthous F, Riche C, Beaune P, Ratanasavanah D (1993) Both cytochrome P450 1A and 3A4 are involved in the N-demethylation of Tamoxifen, [abstract], *5th European ISSX Meeting*, Vol. 3, pp44, 1993 September 26-29, Tours, France
- Sissung TM**, Price DK, Sparreboom A, Figg WD (2006) Pharmacogenetics and regulation of human Cytochrome P450 1B1: Implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Mol. Cancer Res.* **4**:135 – 50
- Southern E**, Mir K, Shchepinov M (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nat. Genet.* **21**:5-9
- Spatzenegger M**, Jaeger W (1995) Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **27**: 397 – 417
- Stearns V**, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA (2003) Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**: 1758 – 64
- Stiborová P**, Hudeček J, Hode P, Frei E (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy* **93**: 229 – 37
- Stingl JC**, Parmar S, Huber-Wechselberg A (2010) Impact of CYP2D6*4 genotype on progression free survival in tamoxifen breast cancer treatment. *Curr Med Res Opin.* **26**:2535-42
- Sun J**, He ZG, Cheby G, Wang SJ, Hao XH, Zou MJ (2004) Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med. Sci. Monit.* **10**: RA5-14
- Sun D**, Chen G, Dellinger RW, Duncan K, Fang JL, Lazarus P (2006) Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res.* **8**:R50
- Sun D**, Sharma AK, Dellinger RW, Blevins – Primeau AS, Balliet RM, Chen G, Boyiri T, Amin S, Lazarus P (2007) Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.* **35**: 2006 – 14

- Sutter TR**, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome *P*450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* **269**: 13092 – 9
- Taheri M**, Mahjoubi F, Omranipour R (2010) Effect of MDR1 polymorphisms on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet Mol Res.* **9**:34-40
- Tan SH**, Lee SCh, Goh Bch, Wong J (2008) Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **14**: 8027 – 41
- Teft WA**, Mansell SE, Kim RB (2011) Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab. Dispos.* **39**: 558 – 62
- Teft WA**, Gong IY, Dingle B, Portvin K, Younus J, Vandenberg TA, Brackstone M, Perera FE, Choi Y-H, Zou G, Legan RM, Tirona RG, Kim RB (2013) CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res. And Ther.*139(1): 95-105
- Teh LK**, Mohamed NI, Salleh MZ, Rohaizak M, Shahrin NS, Saladina JJ, Shia JK, Roslan H, Sood S, Rajoo TS, Muniandy SP, Henry G, Ngow HA, Hla U KT, Din J (2012) The Risk of Recurrence in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen Polymorphisms of CYP2D6 and ABC1. *The AAPS Journal.* 14(1):52-9
- Thomas C**, Gustafsson JÅ (2011). The different roles of ER subtypes in cancer biology and Therapy. *Nat.Rev.Cancer.* **11**:597-608
- Thompson AM**, Quinlan P, Bray S, Johnson A, Nikoloff M, Fontecha M, Ferraldeschi R, Howell A, Lawrence J, Newman W (2009) CYP2D6 genotype affects outcome in postmenopausal breast cancer patients Treated with tamoxifen monotherapy [abstract] In *Proceedings of the ASCO Breast Cancer Symposium*, San Francisco, California, USA, 8-10 October, 2009; Abstract 35

- Thompson AM**, Johnson A, Quilan P, Hillman G, Fontecha M, Bray SE, Purdie CA, Jordan LB, Ferraldeschi R, Latif A, Hadfield KD, Clarke RB, Ashcroft L, Evans DG, Howell A, Nikoloff M, Lawrence J, Newman WG. (2011) Comprehensive CYP2D6 genotype and adherence affect outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen monotherapy. *Breast Canc Res Treat.* **125**: 279-87.
- Thürlimann B**, Keshaviah A, Coates AS Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. (2005) A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med.* **353**: 2747 – 57
- Tsukamoto F**, Shiba E, Taguchi T, Sugimoto T, Watanabe T, Kim SJ (1997) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Breast. Canc.* **4**:259-63
- Tucker AN**, Tkaczuk KA, Lewis LM, Tomic D, Lim CK, Flaws JA (2005) Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Lett.* **217**: 61-72
- Vargas-Roig LM**, Gago FE, Tello O, De Civetta MT, Ciocca DR (1999). c-erbB-2 (Her2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer.* **84**:129-34
- Vidová Z**, Čížmáriková M, Dragašek J, Žofčáková S, Kitková S, Mojžíš J (2012). Je možná farmakogenetická predikce terapeutické účinnosti paroxetinu?. *Psychiatr. prax;* **13**(2): 66 – 68
- Visram H**, Kanji F, Dent SF (2010). Endocrine therapy for male breast cancer: rates of toxicity and adherence. *Curr Oncol.* **17**(5): 17-21
- Vlček J**, Topinková E, Ficková D (2002). Role P- glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích. *Remedia;* **12**(3): 207-213
- Walker AH**, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, Olopade OI, Weber BL, Rebbeck TR (1998) Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk, Mutations in brief no. 191. Online. *Hum Mutat.* **12**: 289
- Wedlund PJ** (2000) The CYP2C19 enzyme polymorphism. *Pharmacology* **61**:174 -83

- Wegman P**, Vainikka L, Stal O, Nordenskjold B, Skoog L, Rutqvist LE, Wingren S (2005) Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **7**: R284 – 90
- Wegman P**, Elingarami S, Carstensen J, Stal O, Nordenskjold B, Wingren S (2007) Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* **9**: R7
- Widschwendter M**, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Müller-Holzner E (2004) Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.* **64**:3807-13
- Winzer R**, Langmann P, Zilly M, Ullmann F, Schubert J, Klinker H, Weissbricht B. (2005) No influence of the P-glycoprotein polymorphisms MDR1 G2677T/A and C3435T on the virological and imunological response in treatment naive HIV-positive patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **4**: 3
- Wlcek K**, Svoboda M, Sellner F, Krupitza G, Jaeger W, Thalhammer T (2008) Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biol and Therapy.* **7**(9):1450-55
- Wu X**, Hawse JR, Subramaniam M, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC (2009) The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res.* **69**: 1722 – 27
- Yazdi MF**, Rafieian S, Gholi-Nataj M, Sheikhha MH, Nazari T, Neamatzadeh H (2015) CYP2D6 Genotype and Risk of Recurrence in Tamoxifen Treated Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* **16**(15):6783-7
- Yue W**, Wang JP, Li Y, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan PD, Rogan E, Cavalieri E, Santen RJ (2005) Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin Cancer Res.* **11**: 925 – 30
- Zafra-Ceres M**, de Haro T, Farez-Vidal E, Blancas I, Bandres F, Martinez de Dueñas E, Ochoa-Aranda E, Gomez-Capilla JA, Gomez-Llorente C (2014) Influence of CYP2D6 Polymorphisms on Serum Levels of Tamoxifen Metabolites in Spanish Women with Breast Cancer. *Int J Med Sci.* **10**(7):932-37

- Zanger UM**, Raimundo S, Eichelbaum M (2004) Cytochrome P450 2D6:overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**: 23 – 37
- Zanger UM**, Klein K, Saussele T, Blievernicht J, Hofmann MH, Schwab M (2007) Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics* **8**: 743 – 59
- Zanger UM**, Turpeinen M, Klein K, Schwab M (2008) Functional farmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal . Bioanal. Chem.* **392**: 1093 – 1108
- Zhang X**, Pu Z, Ge J, Shen J, Yuan X, Xie H (2015). Association of CYP2D6*10, OATP1B1, A388G and OATP1B1 T521C Polymorphisms and Overall Survival of Breast Cancer Patients after Tamoxifen Therapy. *Med. Sci. Monit.* **21**:563-9
- Zima T**, Slanař O, Drapáková (2006) Zkušenosti sdiagnostikou cytochromu P50ve VFN. *Labor Aktuell* **3**: 4-6
- Zembutsu H**, Nakamura S, Akashi-Tanaka S, Kuwayama T, Watanabe C, Takamaru T, Takei H, Ishikawa T, Miyahara K, Matsumoto H, Hasegawa Y, Kutomi G, Shima H, Satomi F, Okazaki M, Zaha H, Onomura, M, Matsukata A, Sagara Y, Baba S, Yamada A, Shimada K, Shimizu D, Tsugawa K, Shimo A, Yu ET, Hartman H, Wan CC, Lee SC, Nakamura Y (2016) Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 on Response to Tamoxifen Therapy for Breast Cancer, a Prospective Multicentr Study. *Clin Cancer*

8 PŘÍLOHY

PŘÍLOHA I

S. ARGALÁCSOVÁ, O. SLANAŘ, P. VÍTEK, P. TESAŘOVÁ, H. BAKHOUCHE,
M. DRAŽĐÁKOVÁ, O. BARTOŠOVÁ, T. ZIMA, L. PERTUŽELKA

**Contribution of *ABCB1* and *CYP2D6* Genotypes to the Outcome of Tamoxifen
Adjuvant Treatment in Premenopausal Women With Breast Cancer**

Physiol. Res. 64 (Suppl. 4): S539-S547, 2015

IF: 1,618₂

Contribution of *ABCB1* and *CYP2D6* Genotypes to the Outcome of Tamoxifen Adjuvant Treatment in Premenopausal Women With Breast Cancer

S. ARGALÁCSOVÁ^{1,2}, O. SLANAŘ^{2,3}, P. VÍTEK⁴, P. TESAŘOVÁ¹, H. BAKHOUCHE², M. DRAŽDÁKOVÁ³, O. BARTOŠOVÁ², T. ZIMA³, L. PERTUŽELKA¹

¹Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic, ²Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic, ³Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic, ⁴Institute of Radiotherapy, First Faculty of Medicine, Charles University and Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic

Received September 17, 2015

Accepted October 12, 2015

Summary

Recent pre-clinical evidence suggests that the active metabolite of tamoxifen, endoxifen, is a substrate for efflux pump P-glycoprotein. The aim of our study was to evaluate, if the polymorphisms within *ABCB1* gene alter tamoxifen adjuvant treatment efficacy in premenopausal women. Totally 71 premenopausal women with estrogen receptor positive breast cancer indicated for tamoxifen adjuvant treatment were followed retrospectively for median period of 56 months. The genetic polymorphisms of *CYP2D6* and *ABCB1* were analyzed and potential covariates as tumor grading, staging, age at the diagnosis, comedication, quantitative positivity of ER or PR were also evaluated. Cox proportional-hazards regression model indicated that patients carrying at least one variant allele in *ABCB1* rs1045642 had significantly longer time to event survival compared to wild type subjects. Non-significant trend was noted for better treatment outcome of patients carrying at least one variant allele in the SNP rs2032582, while for the *CYP2D6* polymorphism poor metabolizer phenotype resulted in worse outcome in comparison to extensive metabolizers subjects with HR of 4.04 (95 % CI 0.31-52.19). Similarly, patients using *CYP2D6* inhibitors had non-significantly shorter time-to-event as compared to never users resulting in hazard ratio of 2.06 (95 % CI 0.40-10.63). *ABCB1* polymorphisms may affect outcome of tamoxifen adjuvant treatment in premenopausal breast cancer patients. This factor should be taken into account in

addition to the *CYP2D6* polymorphism or phenotypic inhibition of *CYP2D6* activity.

Key words

P-glycoprotein • SNP • Pharmacogenomics • Tamoxifen • *CYP2D6*

Corresponding author

O. Slanař, Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Albertov 4, 128 00 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420224968104, E-mail: oslan@lf1.cuni.cz

Introduction

Breast cancer is the most frequent cancer affecting women worldwide. Its incidence and prevalence has been steadily rising and search for predictive biomarkers of prognosis and therapeutic success is one of the major challenges for oncologists today.

The large interindividual variability in the treatment response is driven by both genetic diversity of patients as well as factors associated with tumor (Higgins *et al.* 2009). One of the therapeutic modalities of choice and one of the first targeted therapies for patients with hormone-positive breast cancer is hormone therapy. Since the early 1980s, adjuvant therapy with tamoxifen has been the gold standard for reducing risk of recurrence in women with estrogen receptor positive breast cancer.

Long-term data have demonstrated that the use of tamoxifen reduced recurrence and mortality by more than 30 %. However, meta-analyses of comparative studies on the adjuvant hormonal therapy in postmenopausal patients with hormone-dependent tumor indicate higher efficacy of aromatase inhibitors (AI) over tamoxifen treatment (Forbes *et al.* 2008, Howell *et al.* 2005). Despite the conclusions drawn from these studies tamoxifen remains the important treatment option in patients with hormone-dependent breast cancer. It remains a first line option for premenopausal women and in the prophylaxis of carcinoma *in situ*. Also in postmenopausal women tamoxifen is still frequently used.

The results of the ATAC study show difference in recurrence rates between tamoxifen and IA groups less than 5 % (Forbes *et al.* 2008, Schroth *et al.* 2009). Therefore, if there were any biomarkers for prediction of treatment response to tamoxifen, some subgroups of postmenopausal women could benefit from tamoxifen to the same extent or even more than from IA application. CYP2D6 activity has been proposed as one of the potential biomarkers, since it is the liver drug-metabolizing enzyme responsible for *in vivo* conversion of tamoxifen. The antiestrogenic activity of tamoxifen is dominantly mediated through the active metabolites 4-hydroxytamoxifen, and 4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen (endoxifen) that possess approximately 100 times higher affinity to estrogen receptors than the parent compound itself (Brauch *et al.* 2008). It has been shown that extensive metabolizers of CYP2D6 have higher endoxifen plasma levels compared to patients with genetic CYP2D6 deficiency and similar decrease in endoxifen exposition has been observed in patients receiving paoxetine, a strong CYP2D6 inhibitor, as a comedication to tamoxifen compared to patients, who did not use any CYP2D6 inhibitor (Stearns *et al.* 2003).

Based on pharmacokinetic data it could be expected that less enzymatic activity reduces the bioactivation of tamoxifen and its efficacy may be reduced.

Pharmacogenetic studies estimated that a considerable proportion of caucasian patients carried a functionally deficient CYP2D6 allele, while the CYP2D6*4 variant (1846G>A) was the most prevalent one (Bradford 2002, Buzkova *et al.* 2008, Sachse *et al.* 1997). Approximately 5-10 % of Caucasians are predicted as CYP2D6 poor metabolizers (PM) with complete enzyme deficiency and approximately 40 % of

the population represent heterozygous extensive metabolizers or intermediate metabolizers (IM), who possess partially decreased CYP2D6 activity in comparison with extensive metabolizers (homozygous wild type allele carriers, EM) (Buzkova *et al.* 2008, Kirchheiner 2008, Zanger *et al.* 2004).

Previous publications provided evidence that endoxifen is substrate for an active efflux transport pump P-glycoprotein (Iusuf *et al.* 2011, Teft *et al.* 2011). Plasma endoxifen levels did not significantly differ between wild-type and Mdr1-deficient mice. However, brain concentrations of endoxifen were nearly 20-fold higher in Mdr1-deficient mice compared to wild-type animals. Because P-glycoprotein is highly expressed at the blood-brain barrier and in some breast cancer tumors, variation in expression and function of this transporter may alter the therapeutic outcome of tamoxifen treatment. Many polymorphisms have been identified in the ABCB1 gene coding for P-glycoprotein (multidrug-resistance gene-MDR-1) some of which have functional consequence for the expression of the gene in the target tissues and/or transport capacity of the substrates (Hoffmeyer *et al.* 2000, Sakaeda *et al.* 2003). Therefore, we conducted this study to evaluate, if the genetic polymorphisms rs1045642 and rs2032582 within the ABCB1 gene that may affect the expression of the P-glycoprotein efflux pump affect the therapeutic efficacy of tamoxifen treatment in premenopausal women, while CYP2D6 status was taken into account as well.

Methods

Premenopausal patients with breast cancer indicated to 5 year adjuvant tamoxifen treatment with or without adjuvant chemotherapy between 1985-2011 complying with the inclusion criteria have been selected for this study. The study was conducted in the single centre at the Department of Oncology, General Teaching Hospital in Prague and the responsible Ethics committee approval was obtained before the study start up. All enrolled patients signed informed consent.

The main inclusion criteria included histologically confirmed breast cancer, estrogen receptor positivity of at least 10 %, primarily local or loco-regional stage of the disease (I-III).

The exposure to comedications known as CYP2D6 inhibitors that could confound the CYP2D6 activity was recorded. The comedication effect on

CYP2D6 has been reviewed based on interaction table at <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.aspx>

We summarized each patient's medical history by searching the hospital records. Tumor stage was classified according to Union for International Cancer Control guidelines and summarized as stage I, II, or III. TNM classification was considered at the time of diagnosis. Adverse effects were recorded and classified according to organ system that has been affected. Patients receiving tamoxifen for less than 6 months due to adverse effects have been excluded from this study. This study was retrospective; the primary analysis was conducted on time-to-event end points as time to recurrence-disease free survival (DFS) or time to progression (TTP).

Genotyping

Samples of peripheral venous blood for DNA isolation were collected in tubes containing K₂EDTA and immediately frozen and stored at -20 °C until further processing. DNA was subsequently isolated using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd.). Detection of the polymorphisms in *CYP2D6* gene was done by AmpliChip (Roche) microarray based method. The following alleles have been detected *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14, *15, *17, *19, *20, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *36, *40, *41 and duplication/multiplication of the gene. After exclusion of the presence of any of the above mentioned alleles, wild type *CYP2D6**1 genotype has been assigned.

The genotypes of *ABCB1* (rs2032582 and rs1045642) were determined using a modified analysis by Cascorbi *et al.* (2001). DNA amplification was done in a thermocycler My-Cycler (BioRad, USA). Reaction mixture consisted from 60 ng of DNA template, 8 nM primers (sequence was identical to the primers used by Cascorbi *et al.* (2001), PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP and 0.5 U of Tag DNA polymerase. Water was added to a final volume of 25 µl. PCR amplification consisted of initial denaturation for 2 min at 94 °C followed by 35 cycles denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min. Terminal elongation ran at 72 °C for 7 min. Restriction by enzymes BseNI, BshNI, and BspI431 produced DNA fragments that were separated on 3.5 % agarose gel and visualized after ethidium bromide staining on the ultraviolet transilluminator.

Statistical analysis

The time to recurrence/progression was calculated from the date of diagnosis. All recurrences/progressions were taken into account. Data of event-free patients were censored as of the date when the last follow-up information was obtained. Allelic distribution was evaluated comparing with Hardy-Weinberg equilibrium.

The statistical significance of differences was tested using the Kruskal-Wallis test. A Pearson's χ^2 test was used for categorical data. The primary analysis of time-to-event end points was performed with the use of Mantel-Cox test.

Analysis was performed on subgroups defined by the factors that had been determined: age, staging and grading of the disease, degree of ER positivity and degree of PR positivity. The probability of event-free survival was estimated with the Kaplan-Meier technique. For the analysis of prognostic factors, a Cox proportional-hazards model was used. All relevant tests were performed at the 5 % level of significance.

Results

Seventy-one patients have been enrolled into the study. Median age of the patients at the time of diagnosis was 44 years (range 26-52 years) and median follow-up was 56 months (range 8-198 months). The basic clinical characteristics of the study population are summarized in the Table 1. The genotypes of *CYP2D6*, and *ABCB1* polymorphisms rs2032582 and rs1045642 are summarized in the Table 2. The distribution of the variant alleles in our study population did not substantially differ from normal distribution. We noted 12 (16.9 %) of patients, who received inhibitors of *CYP2D6* as comedication to tamoxifen treatment.

There were statistically non-significant differences between subgroups of patients according to tumor size at the time of diagnosis, although the tendency towards less frequent progression among T1 stage patients was observed with 12.1 %, 31.5 %, and 20.0 % of progressing patients within the subgroups of T1, T2, and T3, respectively.

Further analyses revealed that neither the quantification of estrogen/progesterone receptor positivity nor age of the patients nor tumor grading at time of diagnosis represented a prognostic factor for treatment outcome.

Table 1. Clinical characteristics of the study population (n=71).

Characteristics	n (%)
Stage – tumor size (T)	
T1 ≤ 2 cm)	43 (60.6 %)
T2	19 (26.8 %)
T3	3 (4.2 %)
T4	1 (1.4 %)
Tx	2 (2.8 %)
Tis	3 (4.2 %)
N status	
N0	45 (63.4 %)
N1	21 (29.6 %)
N2-3	2 (2.8 %)
Nx	3 (4.2 %)
Histology	
IDC	52 (73.2 %)
ILC	10 (14.1 %)
Mixed (ILC+IDC)	4 (5.6 %)
Other	5 (7.4 %)
Grade	
G1	15 (21.1 %)
G2	24 (33.8 %)
G3	11 (15.5 %)
Gx	21 (29.6 %)
PR status	
PR positive (≥ 10 %)	62 (87.3 %)
PR negative	7 (9.9 %)
PR unknown	2 (2.8 %)
Her-status	
Negative	46 (64.8 %)
FISH positive	6 (8.5 %)
Unknown	19 (26.7 %)
Chemotherapy	
Adjuvant	27 (38.0 %)
Neoadjuvant	9 (12.7 %)
Both – adjuvant plus neoadjuvant	4 (5.6 %)
No chemotherapy	31 (43.7 %)
Radiotherapy	
Yes	48 (67.6 %)
No	20 (28.2 %)
Unknown	3 (4.2 %)
Local therapy	
Mastectomy	29 (40.8 %)
Segmentectomy/Tumorectomy	42 (59.2 %)

Table 2. Distribution of the CYP2D6 predicted phenotypes and *ABCB1* polymorphisms in the study population.

	n (%)
CYP2D6 predicted phenotype	
UM	1 (1.4 %)
EM	34 (47.9 %)
hetEM	29 (40.8 %)
PM	7 (9.9 %)
rs1045642	
CC	17 (23.9 %)
CT	41 (57.8 %)
TT	13 (18.3 %)
rs2032582	
GG	24 (33.8 %)
GT	34 (47.9 %)
TT	11 (15.5 %)
GA	1 (1.4 %)
TA	1 (1.4 %)
AA	0 (0 %)

With a median follow-up of 56 months in the whole group the median time to event was 156 months. Survival analysis shows that although there was no significant difference of the time-to-event end points among CYP2D6 genotype groups a tendency towards shorter recurrence/progression free survival in PM group in comparison to EM group was noted. The hazard ratio in PM group was 4.04 (95 % CI 0.31-52.19) in comparison to EM subjects. Similarly, patients using CYP2D6 inhibitors had non-significantly shorter time-to-event as compared with never users resulting in hazard ratio of 2.06 (95 % CI 0.40-10.63). Tendency towards more frequent progression/relapse has been observed in patients with CYP2D6 deficiency as suggested by cumulative progression/relapse rates over the follow up period of 11.8 %, 20.7 %, and 28.6 % in the EM, heterozygous EM, and PM groups, respectively. The Figure 1 shows Cox proportional-hazards regression model for the whole study population. The Kaplan-Meier analyses showing survival curves for subgroups as determined by CYP2D6, and *ABCB1* polymorphisms rs1045642, rs2032582 and comedication status are shown in the Figure 2. Out of these possible predictors for the time-to-event endpoint, only *ABCB1* polymorphism rs1045642 reached statistical significance. The treatment outcome was significantly better in either homozygous or

heterozygous carriers of the variant allele compared to the wild-type ($P=0.012$).

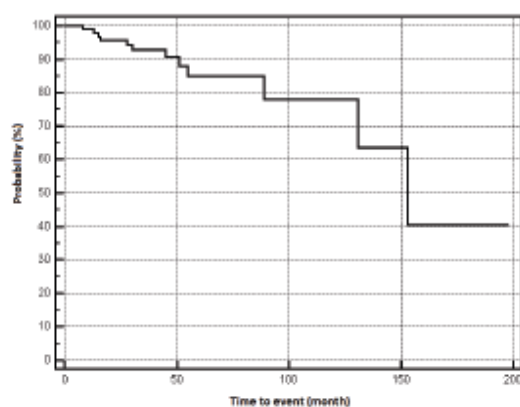


Fig. 1. Time to event survival probability in the study population.

Discussion

The genotype distribution in the study population is not only compliant with the theoretical normal distribution, but also very similar to distribution of *CYP2D6* and *ABCB1* variants in the Czech healthy population as documented by comparison with a „historical control groups“ formed in our previous studies (Buzkova *et al.* 2008, Pechandova *et al.* 2006). Such a comparison suggests that there was no obvious selection preference of a specific *CYP2D6* or *ABCB1* phenotype/genotype, as could for e.g. happen in case of intolerance of some treatment. Further, the *CYP2D6* or *ABCB1* polymorphisms do not belong to known susceptibility factors for breast cancer (Rodriguez-Antona *et al.* 2006), therefore the distribution of the polymorphic alleles is expected to be similar to that in the healthy population in the same region as noted in our study.

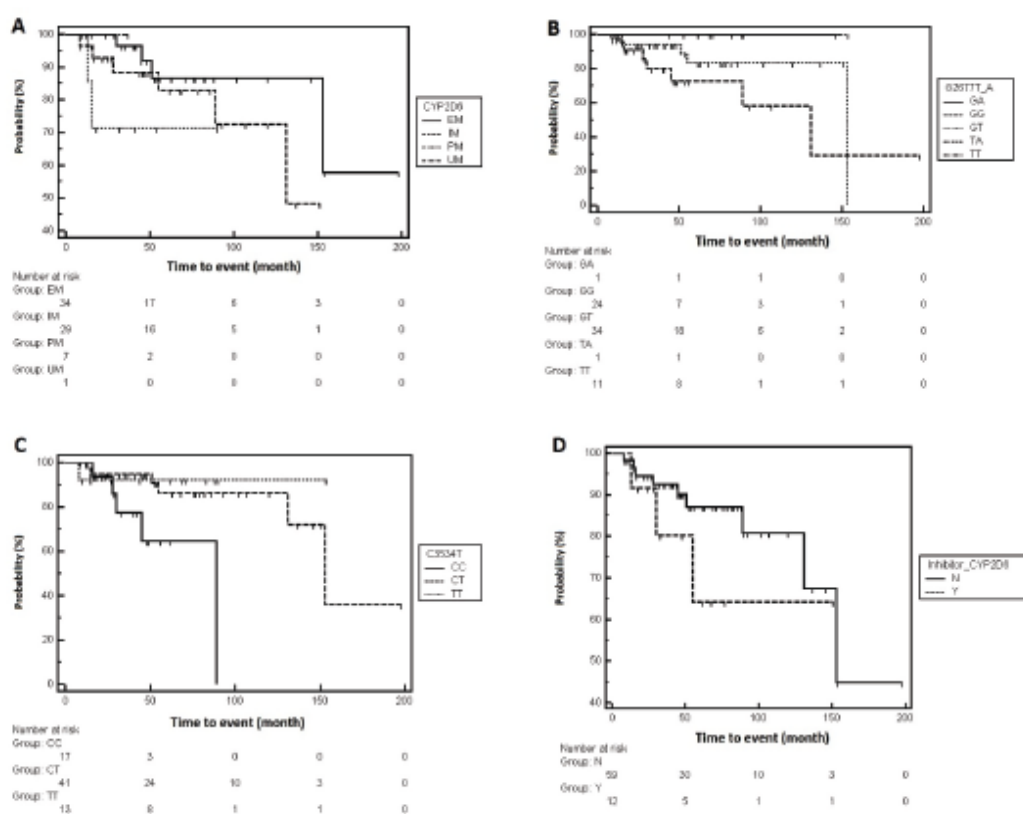


Fig. 2. Kaplan-Meier analysis of the time to event stratified by (A) *CYP2D6* predicted phenotype status, (B) *ABCB1* polymorphism rs2032582 (G2677T/A), (C) *ABCB1* polymorphism rs1045642 (C3435T), and (D) presence of *CYP2D6* inhibitory comedication.

This study was conducted in premenopausal patients, who represent currently the most appropriate primary target population for tamoxifen treatment according to current therapeutic guidelines (Burststein *et al.* 2014). Since this subpopulation represents approximately one third of the breast cancer patients, this inclusion criterion contributed to the lack of statistical significance of the survival analyses noted for all the genetic factors except *ABCB1* rs1045642. However, the results of our study suggest that diminished activity of CYP2D6 may represent an important risk factor for worst treatment outcome of adjuvant tamoxifen therapy. Firstly, when taking into account only the extreme genotypes of PM and EM groups the hazard ratio of 4.04 of PM subjects found in our study is considerably high although displaying substantial variability. Secondly, the event free survival time is shorter also in CYP2D6 deficiency combining both genotypic CYP2D6 deficiency and possible drug-drug interactions in EM subjects although the hazard ratio value is less (2.06). Such a hazard ratio is potentially still of clinical relevance for individual patients. Thirdly, PM group displayed not only shorter time to event, but also a proportion of patients with detected progression/relaps during the follow up tended to be higher, though again not reaching level of statistical significance. In this aspect our study endorses the previous findings suggesting CYP2D6 polymorphism as a possibly important risk factor for the prognosis of adjuvant treatment.

Indeed, some published studies demonstrate a higher risk of recurrence of the disease and shortening of DFS in patients carrying functionally variant alleles of CYP2D6 (Bonanni *et al.* 2006, Goetz *et al.* 2005, 2007, Newman *et al.* 2008, Schroth *et al.* 2007, 2009, Trojan *et al.* 2013, Yazdi *et al.* 2015).

Meta-analysis of ten previous clinical reports (n=5183) reported significantly increased risk of breast cancer recurrence in patients carrying variant CYP2D6 genotypes (Jung *et al.* 2014). Significant effect of CYP2D6 on treatment outcome in pre-menopausal subpopulation was published recently (Saladores *et al.* 2015).

By analogy, a decrease of tamoxifen efficacy could be expected in patients using comedications with CYP2D6 inhibitors (e.g. antidepressants) (Kelly *et al.* 2010).

However, there are clinical trials with contradictory results not confirming the CYP2D6 dependency of tamoxifen effects either as a result of inherent deficiency or comedications (Abraham *et al.*

2010, Nowell *et al.* 2005, Wegman *et al.* 2005, 2007). Therefore, due to the inconclusive evidence standardized testing patients has not been implemented into the clinical praxis (Dezentje *et al.* 2009) while the drug regulatory agencies in the EU adopted a label change for tamoxifen providing information on the discrepant results and the clinical need for factors predicting efficacy of the treatment that remain largely unmet.

Our study is different from most previously published as only premenopausal women have been enrolled. It is well documented that the premenopausal women have worse prognosis in general, either as consequence of less awareness of this disease in the younger population or due to a different pathophysiological background of the disease in pre-, and post-menopausal population for e.g. more intense estrogen load in premenopausal women. Thus some discussion still continues if the disease in the two menopausal status groups shall not be regarded as substantially different. In that aspect our study contributes by providing the data in subgroup representing minority of the general patient population. However, since the recent therapeutic guidelines change, the premenopausal population is the primary target population for tamoxifen adjuvant therapy.

This is to our best knowledge the first study describing possible impact of *ABCB1* polymorphisms (rs2032582, rs1045642) on the treatment outcome of tamoxifen therapy in premenopausal breast cancer patients. Significantly shorter time to event has been observed for the wild-type homozygous patients in the rs1045642 polymorphism as compared with the heterozygous or homozygous carriers for the variant allele. The variant allele in this polymorphism has been reported to result in decreased P-glycoprotein expression leading to reduced efflux activity of the active transporter. Therefore our observation may reflect increased intracellular exposure to the tamoxifen active moiety in the target tissue leading to better treatment outcome in patients carrying the variant allele. However, our study was not designed in a way to clarify the mechanisms behind the findings. Although the differences between the genotype subgroups for the rs2032582 polymorphisms have not reached statistical significance, the survival analysis shows similar tendency as was noted in the rs1045642 polymorphism, i.e. trend for decreased time to event time in the wild type homozygous group as compared with the variant allele carriers.

ABCB1 polymorphisms may affect outcome of tamoxifen adjuvant treatment in premenopausal breast cancer patients. This pharmacogenetic factor should be taken into account in addition to the *CYP2D6* polymorphism or phenotypic inhibition of *CYP2D6* activity.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This project was supported by a grant IGA MZ CR No N10563-3 and a Charles University project PRVOUK P25/LF1/2.

References

- ABRAHAM JE, MARANIAN MJ, DRIVER KE, PLATTE R, KALMYRZAEV B, BAYNES C, LUCCARINI C, SHAH M, INGLE S, GREENBERG D, EARL HM, DUNNING AM, PHAROAH PD, CALDAS C: *CYP2D6* gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res* 12: R64, 2010.
- BONANNI B, MACIS D, MAISONNEUVE P, JOHANSSON HA, GUCCIARDO G, OLIVIERO P, TRAVAGLINI R, MURACA MG, ROTMENSZ N, VERONESI U, DECENSI AU: Polymorphism in the *CYP2D6* tamoxifen-metabolizing gene influences clinical effect but not hot flashes: data from the Italian Tamoxifen Trial. *J Clin Oncol* 24: 3708-3709, 2006.
- BRADFORD LD: *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3: 229-243, 2002.
- BRAUCH H, SCHROTH W, EICHELBAUM M, SCHWAB M, HARBECK N: Clinical relevance of *CYP2D6* genetics for tamoxifen response in breast cancer. *Breast Care (Basel)* 3: 43-50, 2008.
- BURSTEIN HJ, TEMIN S, ANDERSON H, BUCHHOLZ TA, DAVIDSON NE, GELMON KE, GIORDANO SH, HUDIS CA, ROWDEN D, SOLKY AJ, STEARNS V, WINER EP, GRIGGS JJ: Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol* 32: 2255-2269, 2014.
- BUZKOVA H, PECHANDOVA K, SLANAR O, PERLIK F: Frequency of single nucleotide polymorphisms of *CYP2D6* in the Czech population. *Cell Biochem Funct* 26: 76-81, 2008.
- CASCORBI I, GERLOFF T, JOHNE A, MEISEL C, HOFFMEYER S, SCHWAB M, SCHAEFFELER E, EICHELBAUM M, BRINKMANN U, ROOTS I: Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 69: 169-174, 2001.
- DEZENTJE VO, GUCHELAAR HJ, NORTIER JW, VAN DE VELDE CJ, GELDERBLOM H: Clinical implications of *CYP2D6* genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin Cancer Res* 15: 15-21, 2009.
- FORBES JF, CUZICK J, BUZDAR A, HOWELL A, TOBIAS JS, BAUM M: Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 9: 45-53, 2008.
- GOETZ MP, RAE JM, SUMAN VJ, SAFGREN SL, AMES MM, VISSCHER DW, REYNOLDS C, COUCH FJ, LINGLE WL, FLOCKHART DA, DESTA Z, PEREZ EA, INGLE JN: Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 23: 9312-9318, 2005.
- GOETZ MP, KNOX SK, SUMAN VJ, RAE JM, SAFGREN SL, AMES MM, VISSCHER DW, REYNOLDS C, COUCH FJ, LINGLE WL, WEINSHILBOUM RM, FRITCHER EG, NIBBE AM, DESTA Z, NGUYEN A, FLOCKHART DA, PEREZ EA, INGLE JN: The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 101: 113-121, 2007.
- HIGGINS MJ, RAE JM, FLOCKHART DA, HAYES DF, STEARNS V: Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo *CYP2D6* genetic testing? *J Natl Compr Canc Netw* 7: 203-213, 2009.
- HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD HP, BROCKMOLLER J, JOHNE A, CASCORBI I, GERLOFF T, ROOTS I, EICHELBAUM M, BRINKMANN U: Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3473-3478, 2000.

- HOWELL A, CUZICK J, BAUM M, BUZDAR A, DOWSETT M, FORBES JF, HOCTIN-BOES G, HOUGHTON J, LOCKER GY, TOBIAS JS: Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365: 60-62, 2005.
- IUSUF D, TEUNISSEN SF, WAGENAAR E, ROSING H, BEIJNEN JH, SCHINKEL AH: P-glycoprotein (ABCB1) transports the primary active tamoxifen metabolites endoxifen and 4-hydroxytamoxifen and restricts their brain penetration. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 710-717, 2011.
- JUNG JA, LIM HS: Association between CYP2D6 genotypes and the clinical outcomes of adjuvant tamoxifen for breast cancer: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 15: 49-60, 2014.
- KELLY CM, JUURLINK DN, GOMES T, DUONG-HUA M, PRITCHARD KI, AUSTIN PC, PASZAT LF: Selective serotonin reuptake inhibitors and breast cancer mortality in women receiving tamoxifen: a population based cohort study. *BMJ* 340: c693, 2010.
- KIRCHHEINER J: CYP2D6 phenotype prediction from genotype: which system is the best? *Clin Pharmacol Ther* 83: 225-227, 2008.
- NEWMAN WG, HADFIELD KD, LATIF A, ROBERTS SA, SHENTON A, MCHAGUE C, LALLOO F, HOWELL S, EVANS DG: Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 14: 5913-5918, 2008.
- NOWELL SA, AHN J, RAE JM, SCHEYS JO, TROVATO A, SWEENEY C, MACLEOD SL, KADLUBAR FF, AMBROSONE CB: Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 91: 249-258, 2005.
- PECHANDOVA K, BUZKOVA H, SLANAR O, PERLIK F: Polymorphisms of the MDR1 gene in the Czech population. *Folia Biol (Praha)* 52: 184-189, 2006.
- RODRIGUEZ-ANTONA C, INGELMAN-SUNDBERG M: Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25: 1679-1691, 2006.
- SACHSE C, BROCKMOLLER J, BAUER S, ROOTS I: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60: 284-295, 1997.
- SAKAEDA T, NAKAMURA T, OKUMURA K: Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 4: 397-410, 2003.
- SALADORES P, MURDTER T, ECCLES D, CHOWBAY B, ZGHEIB NK, WINTER S, GANCHEV B, ECCLES B, GERTY S, TFAYLI A, LIM JS, YAP YS, NG RC, WONG NS, DENT R, HABBAL MZ, SCHAEFFELER E, EICHELBAUM M, SCHROTH W, SCHWAB M, BRAUCH H: Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J* 15: 84-94, 2015.
- SCHROTH W, ANTONIADOU L, FRITZ P, SCHWAB M, MUERDTER T, ZANGER UM, SIMON W, EICHELBAUM M, BRAUCH H: Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 25: 5187-5193, 2007.
- SCHROTH W, GOETZ MP, HAMANN U, FASCHING PA, SCHMIDT M, WINTER S, FRITZ P, SIMON W, SUMAN VJ, AMES MM, SAFGREN SL, KUFFEL MJ, ULMER HU, BOLANDER J, STRICK R, BECKMANN MW, KOELBL H, WEINSHILBOUM RM, INGLE JN, EICHELBAUM M, SCHWAB M, BRAUCH H: Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 302: 1429-1436, 2009.
- STEARNS V, JOHNSON MD, RAE JM, MOROCHO A, NOVIELLI A, BHARGAVA P, HAYES DF, DESTA Z, FLOCKHART DA: Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 95: 1758-1764, 2003.
- TEFT WA, MANSELL SE, KIM RB: Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos* 39: 558-562, 2011.
- TROJAN A, VERGOPOULOS A, BREITENSTEIN U, TAUSCH C, SEIFERT B, JOECHLE W: CYP2D6 phenotype indicative for optimized antiestrogen efficacy associates with outcome in early breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 301-306, 2013.

-
- WEGMAN P, VAINIKKA L, STAL O, NORDENSKJOLD B, SKOOG L, RUTQVIST LE, WINGREN S: Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 7: R284-R290, 2005.
- WEGMAN P, ELINGARAMI S, CARSTENSEN J, STAL O, NORDENSKJOLD B, WINGREN S: Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 9: R7, 2007.
- YAZDI MF, RAFIEIAN S, GHOLI-NATAJ M, SHEIKHHA MH, NAZARI T, NEAMATZADEH H: CYP2D6 genotype and risk of recurrence in tamoxifen treated breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 6783-6787, 2015.
- ZANGER UM, RAIMUNDO S, EICHELBAUM M: Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 23-37, 2004.
-

PŘÍLOHA II

S. ARGALÁCSOVÁ, O. SLANAŘ, H. BAKHOUCHE, L. PERTUŽELKA

Impact of ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen treatment outcomes and adverse events in breast cancer patients.

JBUON. 2017 – doloženo potvrzením o přijetí, IF: 0,88

Editor - in - Chief

A.E. ATHANASIOU

Athens, Greece

Associate Editors

S. Radulović

Beograd, Serbia

Lj. Vučković-Dekić

Beograd, Serbia

S. Karanov

Sofia, Bulgar

M. Kinay

Izmir, Turkey

D. Trafalis

Athens, Greece

OFFICIAL CONFIRMATION OF PUBLICATION ACCEPTANCE

To whom it may concern

Athens, 19/04/2017

This is to officially certify that the article entitled

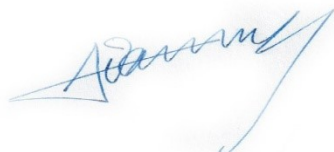
Impact of ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen treatment outcomes and adverse events in breast cancer patients

by

Argalácsová S, Slanař O, Bakhouché H, Pertuželka L

has been accepted for publication in JBUON after peer review.
This article will appear in Vol.22, no.5, 2017 issue of JBUON.

Sincerely,



*A.E. Athanasiou
Editor-in-Chief
JBUON*

Impact of ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen treatment outcomes and adverse events in breast cancer patients

Authors:

Argalácsová S^{1,2*}, Slanař O^{1,3}, Bakhouché H¹, Pertuželka L²

¹ Institute of Pharmacology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

² Department of Oncology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

³ Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

Acknowledgement

This project was supported by a grant from the Ministry of Health of the Czech Republic: N-10563-3 and by the Research Project of the Charles University „Progres Q25/LF1“.

Corresponding Author:

MUDr. Soňa Argalácsová

Institut of Pharmacology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

Albertov 4

128 00 Prague 2

Czech Republic

+420224968104

E – mail: argi@centrum.cz

Abstract

Purpose: This study was designed to evaluate the effect of CYP2D6 and ABCB1 polymorphisms and co-medication on the outcomes and side effects of tamoxifen therapy.

Methods: In total, 258 women (187 postmenopausal and 71 premenopausal) with hormonal positive breast carcinoma were retrospectively evaluated. CYP2D6 polymorphisms were evaluated with AmpliChip (Roche), and polymorphisms of ABCB1 rs2032582 and rs1045642 with RFLP-PCR.

Results: CYP2D6 polymorphisms or co-medication affecting CYP2D6 activity demonstrated no statistically significant effect on the efficacy of tamoxifen therapy or adverse event incidence. There was only a trend towards shortening the time to event (TTE) in CYP2D6-poor metabolisers. ABCB1 polymorphism rs2032582 was not associated with clinical outcomes, while a trend towards an increase in TTE, in variant allele carriers, was noted. The ABCB1 polymorphism rs1045642 demonstrated statistical significance, albeit only in premenopausal patients, i.e. the effect of two variant alleles on the TTE extension was demonstrated only in the premenopausal group ($p = 0.0012$, HR 0.69 (95% CI 0.21 to 2.31), and statistical significance ($p = 0.0106$) only for gynaecological /vasomotor adverse events ($p = 0.0221$, HR = 1.0588), with no evidence of any influence on the incidence and onset of venous complications.

Conclusions: Although we found no conclusive statistical association between the examined polymorphisms and the outcome or incidence of AEs in tamoxifen therapy, the impact of ABCB1 polymorphisms warrants further research. The importance of finding predictive pharmacogenomic biomarkers is a major challenge for individualising and pharmaco-economic rationalisation of the therapy. The latest international guidelines support this notion.

Keywords: Adverse events; Breast cancer; CYP2D6; P-glycoprotein; Polymorphism; Tamoxifen

Introduction

Five years of adjuvant therapy with tamoxifen, the gold standard of hormonal therapy for about 40 years, can reduce the annual risk of breast cancer relapse by 39% [1, 2]. In 2008, the higher efficacy of aromatase inhibitors (IA) was demonstrated in the adjuvant treatment of postmenopausal women, but the analysis of studies indicating IA benefits over tamoxifen show clearly that differences in the relapse rate (RR) between tamoxifen and IA are fewer than 5% [3-6]. The question arises, therefore, whether it is possible to identify a group of postmenopausal women, for whom primary tamoxifen therapy has the same efficacy as IA and thereby streamline therapy targeting, as well as its economic aspects.

The anti-oestrogenic effects of tamoxifen are mostly mediated by its active metabolites of 4-OH-TAM and endoxifen, with 100 times higher affinity to oestrogen receptors (ER) and 30 – 100 times higher ability to stop proliferation [7-9]. Tamoxifen's rate of conversion into its active moieties is mostly dependent on CYP2D6 activity, which can be influenced by genetics as well as iatrogenic factors, i.e. CYP2D6 inhibitors such as SSRI antidepressants [10-11]. The most common variant alleles of *CYP2D6* in the European population is the *CYP2D6*4* allele (allelic frequency 12-21%); in the Asian population it is *CYP2D6*10* (allelic frequency > 50%), and *CYP2D6*17* (allelic frequency 20-35%) in Afro-American populations [12-14]. The European population consists of 5-10% poor metabolisers (PM) and 40% intermediate metabolisers (IM) [15-18]. There is evidence that extensive metabolisers (EM) with two fully active CYP2D6 alleles in postmenopausal patients, compared to patients treated with IA, have the same or an even better five-year disease-free survival (DFS) rate [19]. Other, mostly retrospective, studies suggest that patients with variant alleles (vt) treated with tamoxifen have a higher disease recurrence rate (RR) risk, shorter DFS and worse median overall survival (mOS) [4, 10, 20-25]. In contrast, there is a roughly comparable number of 'negative studies' that do not demonstrate the benefits of *CYP2D6* polymorphism testing [26-29].

The uncertain impact of the anticipated decrease in CYP2D6's effectiveness in relation to tamoxifen therapy has led to a search for other candidate polymorphisms. P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is a human membrane efflux transporter, responsible for the active transport of drugs and xenobiotics [30]. It has been shown that

the overexpression of P-gp, e.g. in association with chemotherapy induction, leads to significantly shorter DFS in breast cancer [19, 31, 32].

In 2012, Teh et al. reported that influence of mutual combination of several polymorphisms on the effect of tamoxifen therapy may be statistically significant even if influence of individual polymorphisms shows no significance. For example, the combination of IM for CYP2D6 and wild-type (wt) homozygotes for *ABCB1* SNP *rs1045642* is associated with significantly shorter relapse-free survival (RFS) [19]. The results of our previously published work in 71 premenopausal patients correlate with Teh's conclusions, in which clear and statistically significant TTE prolongation in the carriers of vt alleles (*T3435T/C*) for *rs1045642*, without any significance attached to the influence of CYP2D6, was found [33].

The role of polymorphisms, and their influence on the occurrence of adverse effects (AEs) associated with tamoxifen therapy (gynaecological AEs and vasomotor hot flushes, as well as venous complications), are barely mentioned in the literature. These issues also deserve further research, because any possibility of predicting AEs that would lead to the discontinuation of therapy is yet another option for therapy individualisation.

Several authors have attempted to systemise and streamline existing data. One meta-analysis of 12 studies (n = 4 973 patients) confirmed a significant reduction in DFS (HR 1.25, p = 0.009), but only if specific inclusion criteria were followed in the selection of patients [25]. Another meta-analysis showed a non-zero but still minimal effect of polymorphisms in *CYP2D6* on the efficacy of tamoxifen therapy, with a stronger association of *CYP2D6*10* alleles than *CYP2D6*4*, and also a minor effect of CYP2D6 inhibitors. Their conclusion saw some merit in searching for links between multiple polymorphisms involved in the metabolism and transport of tamoxifen, and it seems that any resolution in the future will reside in the "whole genome approach" [34,35]. With regard to the controversial results, attempts at 'genotype-guided hormonal therapy' have not led to implementation into clinical practice, and the routine testing of *CYP2D6* and other polymorphisms, at present at least, is not recommended anywhere in the world. In 2015, new indications appeared that the results of BIG-98 and ATAC studies were burdened with a large deviation away from the Hardy-Weinberg equilibrium, probably because of an improper *CYP2D6* genotyping methodology for paraffin-embedded tumour samples, which leads to loss of heterozygosity and a false increase in homozygotes [36-38]. This fact is slowly being reflected in the latest guidelines of professional societies

(ITCP and ASCO), which, contrary to previous negative attitudes on the benefits of *CYP2D6* genotyping, now cautiously admit its possible benefits in practice and call for further development of an accurate algorithm [39-41]. The positive results of our previous premenopausal study lead us to confirm our results in a complex sample of premenopausal and postmenopausal women and also demonstrate the clinical validity of the studied polymorphisms in the terms of most common AEs, with the intention of maximising their predictive value in routine clinical praxis.

Patients and Methods

The project was approved by the Ethics Committee of the General Teaching Hospital in Prague. All patients entering the research were briefed thoroughly about the purpose of the project and became the study based on their free will, expressed by signing an informed consent form.

Clinical characteristics of patients and follow-up

The study included patients regardless of menopausal status and with sufficient immunohistochemical oestrogen receptor positivity (ER at least 10%), with primarily a localised or a locoregionally advanced stage of the disease, who were treated at the Oncology Department, 1st Medical Faculty of Charles University, in Prague between 1985 and 2011. Another inclusion criterion for patient selection was the initiation of hormone treatment with tamoxifen over the course of the therapy. A database of patients was created and the following information was recorded during the research: demographic data, clinical data on the histology and immunohistochemically parameters of the tumours, the extent of the disease and therapy courses and the outcomes of tamoxifen therapy, as well as data on co-medication that could iatrogenically alter *CYP2D6* activity (mostly used inhibitors: fluoxetine, paroxetine, citalopram and escitalopram; mostly used inductors: metoprolol and atenolol). The therapy course was not influenced by the result of polymorphism testing.

Sample preparation and genotyping

DNA was isolated from the blood samples (K₂EDTA) using the standardised method based on the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd.). In the subsequent detection of *CYP2D6* polymorphisms, the AmpliChip (Roche) microchip was used. The procedure detected the alleles *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14, *15,

*17, *19, *202, *25, *26, *29, *30, *31, *35, *36, *40 and *41 as well as gene duplication or multiplication. If the listed alleles were excluded, the case was concluded as a 'wt' allele *CYP2D6*1*. Genotyping of the monitored *ABCB1* polymorphisms (*rs2032582* and *rs1045642*) was carried out through the previously described and validated RFLP-PCR method [33, 42].

Statistical analysis

The primary analysis set out to determine the time to event (TTE – time period from beginning tamoxifen therapy up to any relapse or disease progression, or until the appearance AEs). The data of patients without disease relapse were censored on the date of the last visit in the monitored period with lasting total remission of the disease. The distribution of alleles was compared with the Hardy-Weinberg equilibrium in our population. The dependence of categorical data was studied using a Pearson's chi-square (χ^2) test. Statistical significance was tested using the nonparametric Kruskal-Wallis test ANNOVA. The primary analysis of TTE was performed using the Mantel-Cox test. The probability of an 'event' was evaluated and illustrated using the Kaplan-Meier technique, and the subsequent multivariate testing of predictive power of the monitored parameters was carried out using the usual Cox proportional analysis. The statistical significance threshold was 5% in all tests.

Results

We evaluated 258 patients (187 postmenopausal and 71 premenopausal women). Basic demographic, therapeutic and histological data are presented in Table 1. In 71 premenopausal patients, disease relapsed in 11 (15.5%), with an average TTE of 56.5 months. In the postmenopausal cohort, 53 (31%) patients failed tamoxifen therapy, with an average TTE of 65.9 months.

The frequencies of studied polymorphisms and co-medication usage in all subsets is shown in Table 2. Co-medication was not significantly associated with the outcome of tamoxifen therapy. There was only a trend towards TTE shortening by co-medication of CYP2D6 inhibitors. *CYP2D6* polymorphisms did not show any statistically significant effect on the results of tamoxifen therapy (premenopausal: $p = 0.1955$, $\chi^2 = 4.6959$, postmenopausal: $p = 0.2854$, $\chi^2 = 2.5076$), whilst Cox multifactorial analysis only showed a trend towards the statistical significance of PM polymorphism ($p = 0.0899$, 95% CI = 0.08875 – 5.5506). In the *ABCB1* polymorphism *rs2032582*, there was an assumption that

the presence of a variant allele would lead to decreased P-gp function and the consequent lower conversion and elimination of tamoxifen and its active metabolites, with prolonged exposure and higher efficacy of tamoxifen therapy as a result. In the premenopausal cohort, we found a trend toward a significant effect on TTE ($p = 0.1006$), while the subset of postmenopausal women showed a clear statistical association of *rs2032585* and TTE ($p = 0.0357$) (Figure 1). The results were consistent with our assumption – a statistically significant prolongation of TTE for GT and TT carriers ($p = 0.0187$, $\chi^2 = 13.5544$) – albeit only for T2 and higher stages. In a Cox analysis for the entire cohort and the two subsets, we tested the predictive power of all the observed genetic covariates and co-medication, and found no statistically significant or important correlation in premenopausal and in the whole subset, while the postmenopausal cohort showed a significant shortening of TTE only in minor group of AA carriers in *rs2032585* ($p = 0.0130$, 95% CI = 1.8249-149.2781), a trend toward the significant prolongation of TTE in the most common vt-homozygotes TT and heterozygous GA ($p = 0.0891$, 95% CI = 0.1049-1167), and shorter TTE in users of CYP2D6 inhibitors with no statistical significance ($p = 0.1802$, 95% CI = 0.7916-3.5277) (Figure 2). The statistically significant effect of polymorphisms of *ABCB1 rs1045642* in premenopausal patients was already published [33]. In contrast to these results, there was confirmed no significant association in the postmenopausal or the whole subset ($p = 0.6591$, $\chi^2 = 0.8337$ respectively $p = 0.1882$).

Adverse events (AEs) were noted in 81 patients: 56 patients had gynaecological AEs (endometrial hyperplasia or cancer and/or vasomotor hot flushes); 24 patients had venous complications (deep venous thrombosis or pulmonary embolism) and one patient had both types of complications. An overview of the demographics and distribution of individual AEs is shown in Table 3. The average time taken to develop gynaecological AEs (TTE) was 21 (6-78) months and venous complication 25 (8-60) months. The initial regression analysis confirmed the independence of AEs from the expression of ER (in the tumour!) ($p = 0.782$, F-ratio = 0.07724) and an age of diagnosis ($p = 0.102$, F-ratio = 2.7303). A summary of individual gene polymorphisms for the entire reference group is provided in Table 4. The conclusions of our analysis confirm neither of the above assumptions, and there was no statistically significant effect of CYP2D6 polymorphisms or co-medication on the incidence of AEs during tamoxifen therapy. The initial statistical evaluation of the association between individual polymorphisms and co-medication, and the time to appearance of AEs (TTE), only demonstrated a statistically significant

reduction of TTE among the wt carriers of *ABCB1 rs1045642* ($p = 0.0106$, $\chi^2 = 9.0960$), as illustrated in Figure 3. Furthermore, there was noticeable statistical trend toward a significant effect of *ABCB1* polymorphism *rs2032582* and co-medication on the development of AEs ($p = 0.1300$, $\chi^2 = 4.0804$ and $p = 0.1714$, $\chi^2 = 3.5272$, respectively). Cox analysis of the influence of all studied *ABCB1* polymorphisms on the development of AEs demonstrated again a statistically significant reduction in TTE in carriers of the *ABCB1 rs1045642* (C3435C) wt allele ($p = 0.0135$, 95% CI 1.1906-4.4054) and a statistically significant influence of the variant polymorphism of *rs2032582 TT*. A more detailed analysis of the impact of *ABCB1 rs1045642* polymorphism on the development of individual types of AEs only confirmed a statistical significance in gynaecological AEs ($p = 0.0221$, HR = 1.0588), with no proven effect on risk for venous complications.

Discussion

The advantages of this project primarily include the fact that the identification of polymorphisms was carried out in blood samples, so there is no distortion of genotype distribution due to the loss of heterozygosity, as seen in many patient groups in earlier studies [37, 38]. This is also indicated by the relatively balanced distribution of demographics and the representation of individual polymorphisms in the two subgroups, which correlates with a similar proportion in other publications, and even with respect to the determination of *ABCB1* polymorphisms, it is a rather large cohort [4, 10, 15-29, 32]. The cohort of postmenopausal patients is 2.5 times bigger, because the discussion on the benefit of ‘genotype-guided tamoxifen therapy’ is currently ongoing in postmenopausal women. Another advantage is the systematic analysis of AEs during treatment with regard to all studied polymorphisms. A definite disadvantage is the retrospective, monocentric nature of the study, though the same can be stated in the majority of published studies on this topic. Another disadvantage is the inclusion of hot flushes as a vasomotor AE in the group of gynaecological AEs. We considered hot flushes as an effect associated with hormonal changes, and the main intention was to distinguish venous AEs from the other examples.

In our follow-up, *CYP2D6* polymorphisms and relevant co-medication did not show any statistically significant effect on AE appearance during tamoxifen therapy. Cox analyses repeatedly demonstrated only a tendency of PM for TTE shortening, and even that

was usually in conjunction with other *ABCB1* polymorphisms. Thus, our study supports the results of a series of ‘negative studies’ or the conclusions of meta-analyses that show a non-zero but very minor effect in CYP2D6 PM phenotype as well as a very minor effect of CYP2D6 inhibitors used with tamoxifen [26-29, 34]. Statistically significant effects of variant alleles of *ABCB1* polymorphism *rs1045642* on the prolongation of TTE were only demonstrated in the premenopausal group in our previous publication, but they were not confirmed in the postmenopausal or the whole cohort herein. The question as to why the polymorphism is only significant in premenopausal patients, remains open. The first consideration was the stimulation of P-gp via adjuvant chemotherapy, but our results do not demonstrate separate significance for stages T1 and T2, and, moreover, where one might expect adjuvant chemotherapy prior to hormonal therapy in T2 and higher stages, especially in premenopausal patients; therefore, this reasoning certainly does not explain our results. The analysis of the whole cohort confirmed a certain tendency of polymorphisms toward statistical significance ($p = 0.1882$), and the study published by Teh et al. confirms the reduction in DFS in wt (*rs1045642*) and a further shortening in combination with the PM phenotype of CYP2D6 (from 48 months to 12 months) [19]. We suggest, however, that statistical significance in the premenopausal cohort is caused rather by chance, due to the low number of patients, though there could be a partial impact of this polymorphism on the effectiveness of tamoxifen therapy. The same can be considered for the *ABCB1* polymorphism *rs2032582* results, where, on the contrary, we only found a trend toward a significant effect on TTE in the postmenopausal cohort. However, the specific analysis of particular stages only found significance in T2 and higher stages, while Cox analysis only confirmed the statistical significance in minor AA polymorphism ($p = 0.0130$), thereby demonstrating a trend toward the significant prolongation of TTE in the most common variant homozygotes and shorter TTE in CYP2D6 inhibitors’ co-medication ($p = 0.1802$). Kyiotani found no significant effect of our studied *ABCB1* polymorphisms, though significance was demonstrated for another *rs3740065 ABCC2* polymorphism [10]. A certain, albeit unclear, tendency toward the statistical significance of multiple examined polymorphisms indicates the greater role of a ‘complex genotype’ with several polymorphisms included, rather than the effect of one polymorphism, which supports the findings of the above-mentioned studies [10, 19].

There were 81 patients (33%) with non-selected AEs, 23% gynaecological-vasomotor AEs and 10% venous complications. Our statistical analysis did not show a statistically significant effect of *CYP2D6* polymorphisms or co-medication on the development of AEs, thereby confirming the findings of previously published studies [43-45]. Evaluation of the association of individual polymorphisms and co-medication, and the time to the development of AEs, demonstrated a statistically significant relationship but only in *ABCB1* polymorphism *rs1045642* ($p = 0.0106$), and only for gynaecological and vasomotor AEs ($p = 0.0221$, $HR = 1.0588$). These results support the conclusion of Teh et al., who demonstrated a reduction in the expression of P-gp in variant homozygous patients (TT), with an expected reduction in the elimination of tamoxifen and its active metabolites, thereby prolonging its effect [19]. The reason for statistical significance solely in gynaecological and vasomotor AEs can only be speculated, so further studies are needed to delineate whether it is caused by the differential expression of P-gp in the endometrium and the venous wall, or whether this disparity is a result of a deviation in one of the studied AE groups.

In conclusion, our results support the ‘negative studies’, as we found no conclusive statistical dependence between the examined polymorphisms and the outcome and incidence of AEs in tamoxifen therapy. However, the implied statistical trends and associations in *ABCB1* polymorphism *rs1045642* may lead us to the conclusion that ‘genotype-guided tamoxifen therapy’ is not just a ‘dead end’, as it seemed in recent years, but could be a real sign of new predictors and an increase in the effectiveness of hormone therapy for breast cancer, as confirmed by recent statements made by professional societies [39-41, 43].

Table 1: Demographic, histological and clinical characteristics of patients

Characteristic	PREMENOPAUSAL N=71pts	POSTMENOPAUSAL N=187pts
Median Age (range) [years]	44 (26-52)	57 (43-80)
Average Follow-up (range) [month]	56 (8-198)	91 (6-244)

Length of TMX therapy (range) [month]	43 (8-84)	60 (6-121)
Stage	No (%)	No (%)
T1 (\leq 2cm)	43 (60.6 %)	115 (61.5 %)
T2	19 (26.8 %)	39 (20.8 %)
T3	3 (4.2 %)	6 (3.2 %)
T4	1 (1.4 %)	16 (8.6 %)
Tx	2 (2.8 %)	2 (1 %)
Tis	3 (4.2 %)	9 (4.9 %)
N – Lymph Node status	No (%)	No (%)
N0-mic	45 (63.4 %)	133 (71.1 %)
N1	21 (29.6 %)	39 (29.6 %)
N2-3	2 (2.8 %)	6 (3.3 %)
Nx	3 (4.2 %)	9 (5.0 %)
Histology	No (%)	No (%)
IDC	52 (73.2 %)	139 (74.3 %)
ILC	10 (14.1 %)	28 (15.0 %)
Ductolobular mixed (ILC+IDC)	4 (5.6 %)	13 (6.9 %)
Other Types of Histology	5 (7.4 %)	7 (3.8 %)
Nuclear Grade	No (%)	No (%)
G1	15 (21.1 %)	23 (12.3 %)
G2	24 (33.8 %)	67 (35.8 %)
G3	11 (15.5 %)	35 (18.8 %)
Gx	21 (29.6 %)	62 (33.1 %)

PR status	No (%)	No (%)
PR positive (> 10 %)	62 (87.3 %)	126 (67.4 %)
PR negative	7 (9.9 %)	40 (21.4 %)
PR unknown	2 (2.8 %)	21 (11.2 %)
Her-status	No (%)	No (%)
Negative	46 (64.8 %)	107 (57.2 %)
c-erbB-2 / FISH positive	6 (8.5 %)	31 (16.6 %)
Unknown	19 (26.7 %)	49 (26.2 %)
Chemotherapy	No (%)	No (%)
Adjuvant	27 (38.0 %)	52 (27.8 %)
Neoadjuvant	9 (12.7 %)	18 (9.6 %)
Combined- neoadjuvant and adjuvant	4 (5.6 %)	4 (2.1 %)
Without Chemotherapy	31 (43.7 %)	113 (60.5 %)
Adjuvant Radiotherapy	No (%)	No (%)
Yes	48 (67.6 %)	92 (49.2 %)
No	20 (28.2 %)	95 (50.8 %)
Unknown	3 (4.2 %)	0
Surgical approach	No (%)	No (%)
Mastectomy	29 (40.8 %)	109 (58.3 %)
Segmentectomy/Tumorectomy/Lumpectomy	42 (59.2 %)	78 (41.7 %)

Table 2: Frequency of the *CYP2D6* and *ABCB1* polymorphisms and co medication usage in patient groups

		POSTMENOPAUSAL		PREMENOPAUSAL		ALL PATIENTS	
		No progression/relapse	disease progression/relapse	No progression/relapse	disease progression/relapse	No progression/relapse	disease progression/relapse
CYP2D6	UM	4 (2 %)	0	1 (1 %)	0	5 (2 %)	0
	EM	89 (48 %)	27 (51 %)	36 (48 %)	4 (36 %)	125 (48 %)	31 (48 %)
	IM	80 (42 %)	22 (41 %)	32 (42 %)	6 (55 %)	112 (43 %)	28 (43 %)
	PM	14 (8 %)	4 (8 %)	7 (9 %)	1 (9 %)	21 (9 %)	5 (9 %)
rs2032582	GG(wt)	46 (26 %)	13 (24 %)	27 (36 %)	6 (55 %)	73 (29 %)	13 (23 %)
	GT	91 (53 %)	30 (57 %)	35 (46 %)	5 (45 %)	126 (50 %)	35 (60 %)
	GA	3 (2 %)	2 (4 %)	2 (3 %)	0	5 (2 %)	2 (3 %)
	TT	29 (16 %)	5 (9 %)	12 (16 %)	0	41 (17 %)	5 (9 %)
	AA, TA	5 (3 %)	3 (6 %)	0	0	5 (2 %)	3 (6 %)
rs1045642	C3435C	55 (31 %)	14 (26 %)	18 (24 %)	5 (45 %)	73 (29 %)	19 (30 %)
	C3435T	83 (48 %)	26 (49 %)	44 (58 %)	5 (45 %)	127 (51 %)	31 (48 %)
	T3435T	37 (21 %)	13 (25 %)	14 (18 %)	1 (10 %)	51 (20 %)	14 (22 %)
Co-medication usage	inductor	25 (13 %)**	10 (19 %)	5 (7 %)	1 (9 %)		
	inhibitor	27 (14 %)**	9 (17 %)	12 (17 %)	3 (27 %)		

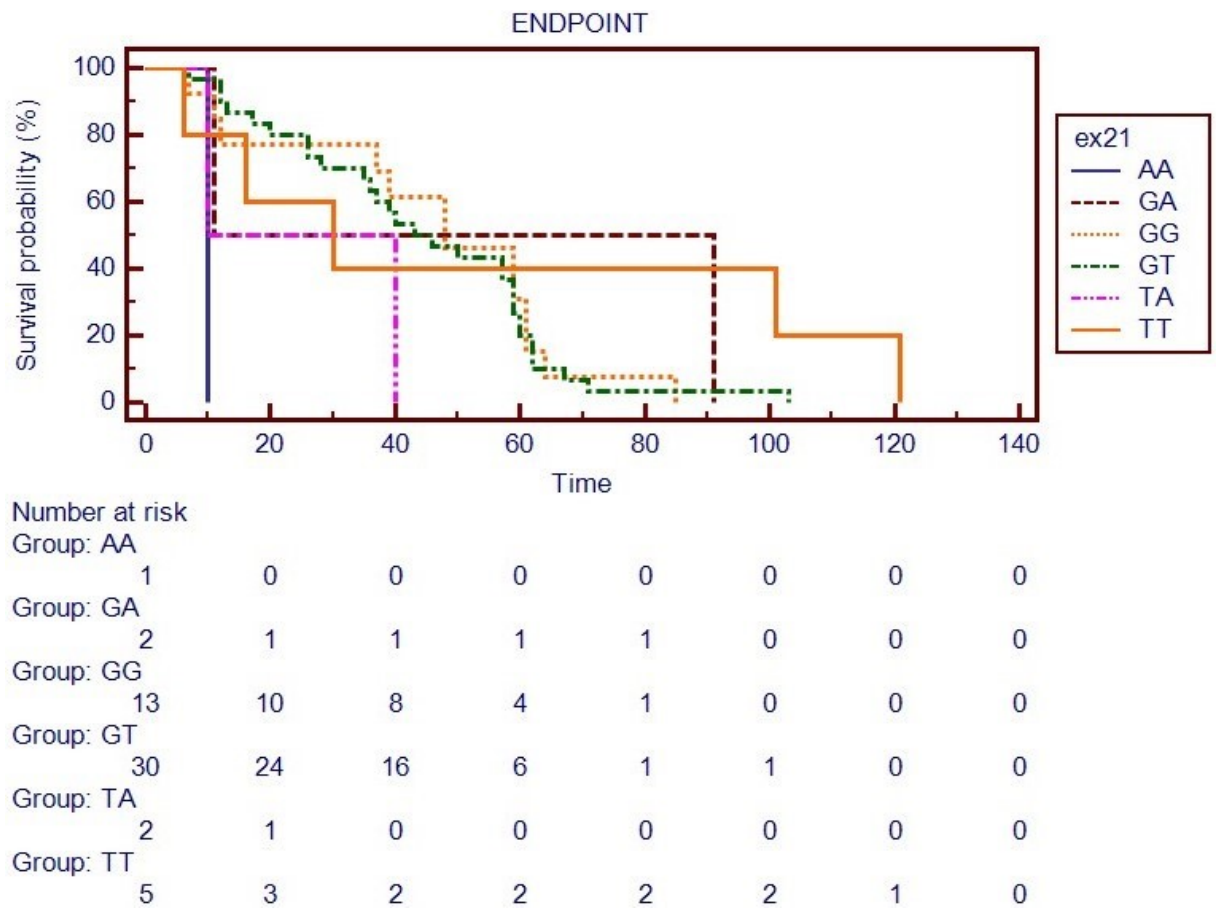


Figure 1: Kaplan-Meier analysis of TTE in postmenopausal patients in relation to *rs2032585 ABCB1* polymorphism

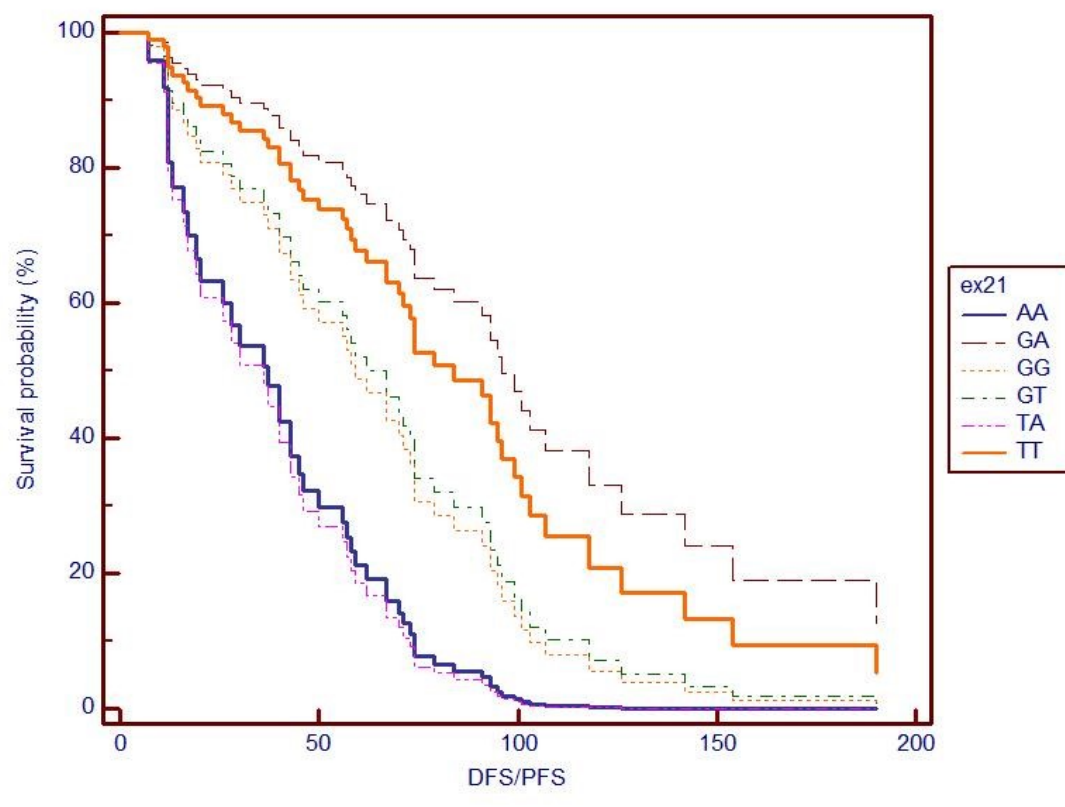


Figure 2: Cox hazard analysis of TTE (DFS/PFS) according to *rs2032585 ABCB1* polymorphism in and all genetic covariates and co-medication a postmenopausal subset

Table 3: Association between demographic and patient characteristics and adverse events (AEs)

	All patients	Without AE	Gynaecolog. AE	Veins AE	Both AE
ALL PATIENTS					
Median age (range) [years]	50 (26 – 80)	48 (30 – 77)	52 (38 – 80)	58 (50 – 80)	58
Average follow-up (range) [months]	74 (6 – 244)	78 (9 – 224)	78 (16 – 198)	85 (40 – 156)	60
Length of TMX therapy (range) [months]	43 (8-84)	60 (9-88)	21 (6 – 78)	25 (8 – 60)	16
PREMENOPAUSAL					
Median age (range) [years]	44 (26-52)	42 (30-51)	44 (39 – 51)	44	-
Averag follow-up (range) [months]	56 (8-198)	66 (9-151)	90 (16 – 198)	40	-

Length of TMX therapy (range) [months]	43 (8-84)	60 (9-88)	29 (6 – 54)	11	-
POSTMENOPAUSAL					
Median age (range) [years]	57 (38 – 80)	57 (46 – 77)	61 (38 – 80)	60 (50 – 80)	58
Averag follow-up (range) [months]	91 (6 – 244)	88 (9 – 224)	71 (45 – 173)	85 (47 – 156)	60
Length of TMX therapy (range) [months]	43 (8-84)	60 (9-88)	23 (6 – 78)	30 (8 – 60)	16

Table 4: Association between analysed polymorphisms or co-medication and adverse events (AEs)

	All patients	Without AE	Gynaecolog. AE	Veins AE	Both AE
CYP2D6					
EM			29 (53 %)	9 (29 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	125 (47 %)	87 (47 %)	23 (2 – 78)	24 (3 – 81)	0
IM			22 (40 %)	13 (61 %)	1
Average AE appearance (range) [months]	112 (42 %)	76 (41 %)	18 (3 – 49)	25 (2 – 60)	16
PM			3 (5 %)	1 (5 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	23 (9 %)	19 (10 %)	18 (2 – 49)	44	0
UM			2 (2 %)	1 (5 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	5 (2 %)	2 (1 %)	8 (5 – 11)	46	0
ABCB1 rs2032582					
	73 (29 %)	45 (26 %)	20 (38 %)	8 (33.3 %)	0

wt-homozygous (GG)					
Average AE appearance (range) [months]			15 (1 – 52)	25 (8 – 51)	0
Heterozygous (GT/A)			21 (40 %)	8 (33.3 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	136 (54 %)	107 (6 2%)	24 (3 – 78)	21 (2 – 46)	0
vt-homozygous (TT / AA)			12 (22 %)	8 (33.3 %)	1
Average AE appearance (range) [months]	41 (17 %)	20 (12 %)	28 (7 – 57)	32 (3 – 81)	16
ABCB1 rs1045642					
C3435C			13 (26 %)	5 (21 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	73 (29 %)	55 (32 %)	11 (1 – 49)	14 (8 – 23)	0
C3435T			21 (43 %)	10 (42 %)	0
Average AE appearance (range) [months]	127 (51 %)	96 (55 %)	26 (2 -78)	28 (2 – 51)	0
T3435T			18 (31 %)	9 (37 %)	1
Average AE appearance (range) [months]	51 (20 %)	22 (13 %)	24 (7 – 57)	32 (2 – 81)	16
Co-medication					
WITHOUT CO-MEDICATION	226 (87 %)	160 (89 %)	42 (76 %)	21 (88 %)	1
					0
INHIBITORS			7 (12 %)	0	0
Average AE appearance (range) [months]	24 (9 %)	17 (11 %)			

			23 (11 – 41)	0	0
INDUCTORS	10 (4 %)	0	7 (12 %)	3 (12 %)	0
Average AE appearance (range) [months]			9 (3 – 23)	23 (12 – 33)	0

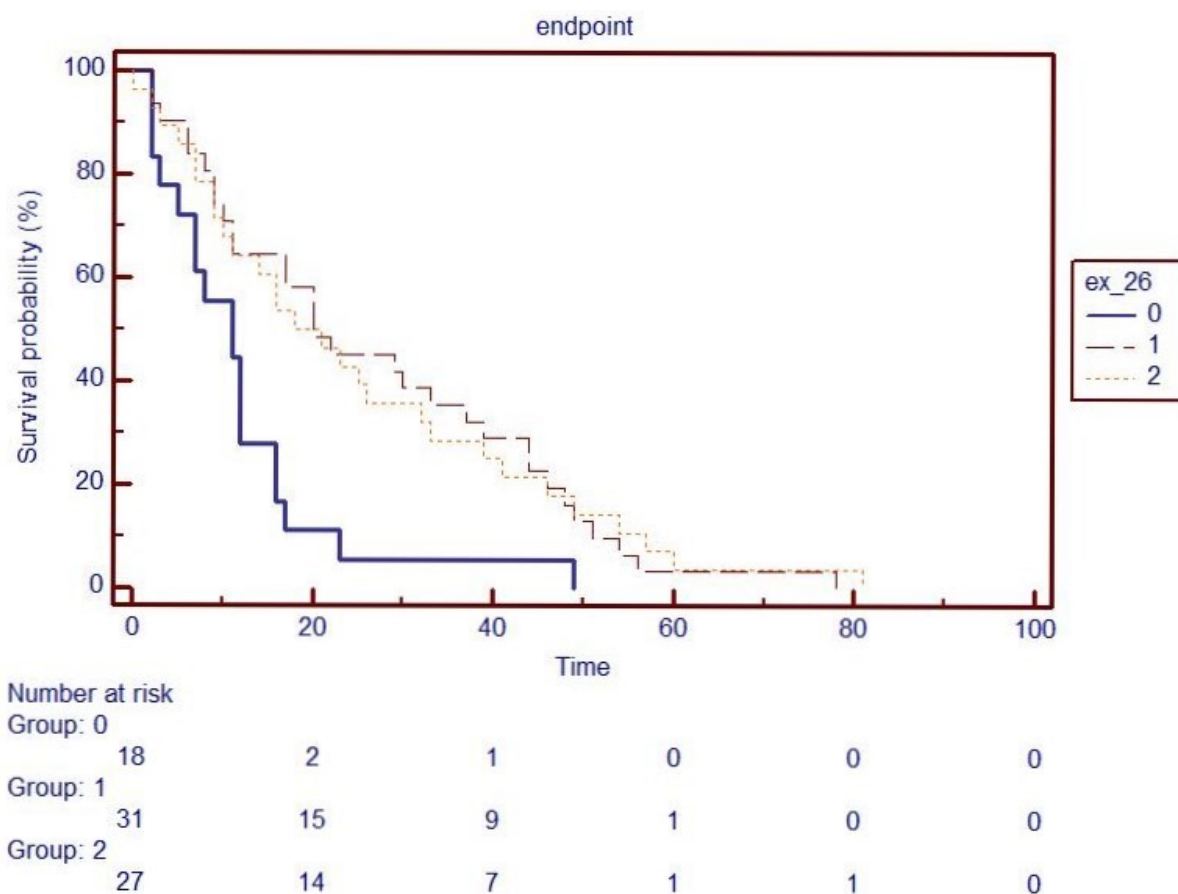


Figure 3: Kaplan-Meier analysis of TTE for non-selected AEs in relation to rs1045642 of ABCB1 polymorphisms

Legends to Tables and Figures

Fig 3:

exon26 = rs1045642 of ABCB1

group 0 = C3435C – wt-homozygote

group 1 = C3435T – heterozygote

group 2 = T3435T – vt-homozygote

ABBREVIATIONS

4-OH-TAM	4-hydroxy-tamoxifen
ABCs	ATP-binding cassettes
ABCB1	ATP-binding cassettes B1 (P-glycoprotein)
AEs	Adverse events
AI	Inhibitors of Aromatase
ASCO	The Committee of the American Society of Clinical Oncology
DFS	Disease free survival
EM	Extensive metabolisers: patients with two fully functional (wild-type) alleles
ER	Oestrogen receptor / Oestrogen Receptor
IM	Intermediate metabolisers: patients with one deficient and one wild type allele
ITPC	International Tamoxifen Pharmacogenetics Consortium
OS	Overall survival
p	P-value
P-gp	P-glycoprotein: a human membrane efflux transporter belonging to the family of ABCs
PM	Poor metabolisers: patients with two deficient (variant/) alleles
PR	Progesterone receptor
RFLP-PCR	Restriction fragment length polymorphisms Polymerase Chain reaction
RFS	Relapse free survival
RR	Recurrence Rate
SNPs	Single-nucleotide polymorphisms
SSRIs	Selective serotonin reuptake inhibitors, antidepressant (e.g. paroxetine, fluoxetine)
T	Tumour size
TTE	Time to Event: a) Time from when tamoxifen therapy starts until relapse or progression of the disease. b) Time to the appearance of adverse events.
UM	Ultra-rapid metabolisers: patients with more than two functional alleles

wt	Wild-type allele – fully functional allele
wt-homozygous	consists of two fully function alleles
vt	variant-type-homozygous: consists of two variant (deficient) alleles

REFERENCES

- [1] Del Re M, Michelucci A, Danesi R: Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer Res Rev* 2012; 38: 442 – 450
- [2] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for early breast cancer on recurrence and 15 – year survival: an overview of the Randomised trials. *Lancet* 2005; 365: 1687 – 1717
- [3] Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS: Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 2747 – 2757
- [4] Schroth W, Goetz MP, Hamann U et al: Association Between CYP2D6 Polymorphisms and Outcomes Among Women With Early Stage Breast Cancer Treated With Tamoxifen. *JAMA* 2009; 302: 1429 – 1436
- [5] Brauch H, Schroth W, Eichelbaum M, Schwab M, Harbeck N: Clinical Relevance of CYP2D6 Genetics for Tamoxifen Response in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2008; 3: 43 – 50
- [6] Borges S, Desta Z, Li L et al: Quantitative effect of CYP2D6 genotype and Inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 61 -74
- [7] Reyes Leó-Cachón RB, Ascacio-Martínez JÁ, Barrera-Saldaña HA: Individual response to drug therapy: bases and study approaches. *Rev Invest Clin* 2012; 64 (4): 364-376
- [8] Lim HS, Lee K, Sook EL et al: Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 3837- 3845
- [9] Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M: Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 392: 1093 – 1108

- [10] Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK et al: Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on Clinical Outcomes of Adjuvant Tamoxifen Therapy for Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1287 – 1293
- [11] Goetz MP, Knox SK, Suman VJ et al: The impact of cytochrome CYP2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101:113 – 121
- [12] Bradford LD: CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics J* 2002;3: 229 – 243
- [13] Rodriguez-Antona C, Ingelman- Sundberg M: Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006; 25:1679 – 1691
- [14] Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M: Pharmacogenomics of tamoxifen therapy. *Clin Chem* 2009; 55: 1770 – 1782
- [15] Kirchheiner J: CYP2D6 phenotype prediction from genotype: which system is the best? *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 225 – 227
- [16] Bijl MJ, van Schaik RHN, Lammers LA et al: The CYP2D6*4 polymorphism affect breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118: 125 – 130
- [17] Buzkova H, Pechandova K, Slanar O, Perlik F: Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 76 – 81
- [18] Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M: Cytochrome P450 2D6:overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 23 – 37
- [19] Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ et al: The Risk of Recurrence in Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen Polymorphisms of CYP2D6 and ABC1. *The AAPS Journal* 2012; 14(1): 52-59
- [20] Goetz MP, Rae JM, Suman V et al: Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9312 – 9318

- [21] Newman WG, Hadfield KD, Latif A et al: Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5913 – 5918
- [22] Jin Y, Desta Z, Stearns V et al: CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 30 – 39
- [23] Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC: Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4 – hydroxytamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 471 – 478
- [24] Schroth W, Antoniadou L, Fritz P et al: Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5187 – 5193
- [25] Province MA, Goetz MP, Brauch H et al: CYP2D6 Genotype and Adjuvant Tamoxifen: Meta-Analysis of Heterogeneous Study Populations. *Clinic Pharmacol and Therap* 2013; 95: 216-227
- [26] Nowell SA, Ahn J, Rae JM et al: Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91: 249 – 258
- [27] Wegman P, Elingarami S, Carstensen J et al: Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R7
- [28] Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE et al: CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res* 2010; 12: R64
- [29] Thompson AM, Johnson A, Quilan P et al. Comprehensive CYP2D6 genotype and adherence affect outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125: 279-287
- [30] Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty Ch, Sauna ZE, Gottesman MM: P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22: 7468 -7485

- [31] Teft WA, Mansell SE, Kim RB: Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos* 2011; 39: 558 – 562
- [32] Cizmarikova M, Wagnerova M, Schonova L et al: MDR1 (C3435T) polymorphism: relation to the risk of breast cancer and therapeutic outcomes. *Pharmacogenetics*. 2010; 10: 62-69
- [33] Argalácsová S, Slanař O, Vitek P et al: Contribution of *ABCB1* and *CYP2D6* Genotypes to the Outcome of Tamoxifen Adjuvant Treatment in Premenopausal Women With Breast Cancer. *Physiol Res* 2015;64 (Suppl.4): S539-S547
- [34] Cronin-Fenton DP, Damkier P, Lash TL: Metabolism and Transport of tamoxifen in relation to its effectiveness: new perspectives on a ongoing controversy. *Future Oncol*. 2014; 10(1):107-122
- [35] Denić A, Radulović SÓ: Basics of cancer pharmacogenomics. *J BUON* 2004;9: 233-241
- [36] Burstein HJ, Temin S, Anderson H et al: Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 2255-2269
- [37] Goetz MP, Sun JX, Suman VJ et al: Loss of Heterozygosity at the CYP2D6 Locus in Breast Cancer: Implications for Germline Pharmacogenetic studies. *JNCI J Natl. Cancer Institut*. 2015; 107(2): doi:10.1093/jnci/dju401
- [38] Johnson JA, Hamadeh IS, Langaee TY: Loss of heterozygosity at the CYP2D6 Locus in Breast Cancer: Implications for Tamoxifen Pharmacogenetic Studies. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2015; 107(2) dju437. doi: 10.1093/jnci/dju437
- [39] Del Re M, Citi V, Crucitta S et al: Pharmacogenetics of CYP2D6 and tamoxifen therapy: Light at the end of the tunnel? *Pharmacol Res* 2016; 107: 398-406
- [40] Hertz DL, Rae JM: One step at a time: CYP2D6 guided tamoxifen treatment awaits convincing evidence of clinical validity. *Pharmacogenomics* 2016;17(8): 823-826

- [41] Goetz MP, Ratain M, Ingle JN. Providing Balance in ASCO Clinical Practice Guidelines: *CYP2D6* Genotyping and Tamoxifen Efficacy. *J Clin Oncol* 2016; 34(32) 3944-3945
- [42] Cascorbi I, Gerloff T, John A et al: Frequency in single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169-174
- [43] Burstein HJ, Temin S, Anderson H et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 2255-2269
- [44] Sestak I, Kealy R, Nikoloff M JF et al: Relationships between *CYP2D6* phenotype, breast cancer and hot flashes in women at high risk of breast cancer receiving prophylactic tamoxifen: results from the IBIS-I trial. *British J Canc* 2012;107: 230 – 33
- [45] Baxter SD, Teft WA, Choi YH, Winkvist E, Kim RB: Tamoxifen-associated hot flash severity is inversely correlated with endoxifen concentration and *CYP3A4**22. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145(2):419-428
- [46] Zembutsu H, Nakamura S, Akashi-Tanaka S, Kuwayama T, Watanabe C et al. Significant Effect of Polymorphisms in *CYP2D6* on Response to Tamoxifen Therapy for Breast Cancer, a Prospective Multicenter Study. *Clin Cancer Res*. October 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1779